

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 124

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES ACIDES HYDROXAMIQUES

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Lyon

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 2 Juin 1976

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Roland GUINET

né le 29 Mai 1949

à LYON (VI)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1978 - 79

ETUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES ACIDES HYDROXAMIQUES

THESE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Lyon

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 2 Juin 1979

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Roland GUINET

Edité par l'Institut Pasteur de Lyon
77, rue Pasteur, 69007 LYON

20 Mai 1979

LYON IVU

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1978 - 1979

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES ACIDES HYDROXAMIQUE



présentée

à l'Université Claude Bernard - Lyon

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 2 Juin 1979
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Roland GUINET
né le 29 Mai 1948
à LYON (VI)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I,

Président : Mr le Pr. D.GERMAIN

Premier Vice-Président : Mr le Pr. ELBAZ

Deuxième Vice-Président : Mr P.PONCET, Maître-Assistant

Troisième Vice-Président : Mr C.BADOR, Etudiant

Secrétaire Général de l'Université : Mr J.RAMBAUD, Administrateur
Civil

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. Médicale Grange-Blanche : Mr le Dr. B.SALLE, Maître de
Conférences Agrégé.

U.E.R. Médicale Alexis-Carrel : Mr le Pr. C.GIROD

U.E.R. Médicale Lyon-Nord : Mr le Pr. J.P.GARIN

U.E.R. Médicale Sud-Ouest : Mr le Pr. J.ROBERT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : Mr le Pr. L.ODDOUX

U.E.R. des Techniques de Réadaptation : Mr A.MORGON, Maître de
Conférences Agrégé.

U.E.R. de Biologie Humaine : Mr le Pr. J.C.CZYBA

U.E.R. d'Education Physique et Sportive : Mr A.MILLON,
Professeur d'E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques : Mr le Dr. R.VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : Mr le Pr. G.MAURY

U.E.R. de Physique : Mr le Pr. R.UZAN

U.E.R. de Chimie et Biochimie : Mr le Pr. J.HUET

U.E.R. des Sciences de la Nature : Mr le Pr. J.BRUN

U.E.R. des Sciences Physiologiques : Mr R.FONTANGES, Maître de
Conférences Agrégé.

U.E.R. de Physique Nucléaire : Mr le Pr. A.SARAZIN

U.E.R. de Mécanique : Mr le Pr. J.MATHIEU

I.U.T. 1 : Mr le Pr. B.POUYET

I.U.T. 2 : Mr J.GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de LYON : Mr le Pr. J.H.BIGAY

Ce travail, qui a pour but de sélectionner par des méthodes simples des molécules nouvelles présentant des activités antibactériennes et antifongiques, est le fruit d'une collaboration interdisciplinaire entre :

- Laboratoire de Chimie Organique II -
Professeur DAUDON -
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques de Lyon -
- Département de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutiques -
Professeur Maurice CARRAZ -
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques de Lyon -
- Laboratoire de Mycologie et Microbiologie Industrielle -
Roland GUINET -
Institut Pasteur de Lyon -

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux différentes personnes qui ont favorisé cette collaboration étroite et qui nous ont permis de mener à bien une étude approfondie de nombreuses molécules de la série des acides hydroxamiques et également de dégager des techniques que nous commençons à appliquer à d'autres séries chimiques.

PLAN

Première Partie :

INTRODUCTION.

1. METHODES D'ETUDE IN VITRO DU POUVOIR ANTIBACTERIEN.

1.1. Détermination de l'activité bactériostatique.

- 1.1.1. Méthode des dilutions en milieu liquide.
- 1.1.2. Méthode des dilutions en milieu solide.
- 1.1.3. Méthode par diffusion.

1.2. Détermination de l'activité bactéricide.

- 1.2.1. Les techniques utilisant les porte-germes.
- 1.2.2. Les techniques utilisant des suspensions de germes -.
 - 1.2.2.1. La mesure du coefficient phénol.
 - 1.2.2.2. Les méthodes utilisant des suspensions sans détermination du coefficient phénol.
 - 1.2.2.2.1. Le "capacity use dilution test".
 - 1.2.2.2.2. Tests visant à éliminer le produit résiduel.
 - a) dilution suffisante du prélèvement mis en subculture.
 - b) neutralisation du produit.
 - c) méthode de centrifugations et de lavages.
 - d) méthode utilisant les membranes filtrantes.

2. BUTS DE TRAVAIL.

Deuxième Partie :

RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UNE SERIE D'ACIDES HYDROXAMIQUES.

1. MATERIEL ET METHODES.

1.1. Produits testés.

1.1.1. Synthèse des dérivés étudiés.

1.1.2. Préparation des solutions mères.

1.2. Etude de l'activité bactériostatique au biophotomètre enregistreur.

1.2.1. Souches bactériennes.

1.2.2. Appareillage.

1.2.3. Technique d'étude - exemple de protocole
expérimental.

1.3. Etude de l'activité fungistatique.

1.3.1. Souches mycéliennes.

- . levures
- . moisissures
- . dermatophytes

1.3.2. Technique d'étude.

2. RESULTATS.

2.1. Activité bactériostatique.

- . courbe de croissance
- . inhibition
- . ralentissement

2.2. Activité fungistatique.

- . CMI

2.3. Produits retenus ayant une activité intéressante.

Troisième Partie :

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PRODUITS RETENUS.

1. MATERIEL ET METHODES.

- 1.1. Produits étudiés.
- 1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par dilution en milieu solide.
 - 1.2.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.2.2. Technique d'étude.
- 1.3. Action sur des bactéries en phase exponentielle de croissance.
 - 1.3.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.3.2. Technique d'étude.
- 1.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) par filtration sur membrane.
 - 1.4.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.4.2. Appareillage.
 - 1.4.3. Technique d'étude.

2. RESULTATS.

- 2.1. Concentrations minimales inhibitrices - CMI
- 2.2. Action sur les bactéries en phase exponentielle de croissance.
- 2.3. Concentrations minimales bactéricides - CMB

Quatrième Partie :

DISCUSSION.

1. CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES - CMI -
 - 1.1. Activité fungistatique.
 - 1.2. Activité bactériostatique.
 - 1.3. Intérêt de l'étude au biophotomètre.
2. ACTION SUR LES BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE ET CONCENTRATIONS MINIMALES BACTERICIDES - CMB -
3. ESSAI DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.
 - 3.1. Structure et spectre d'action.
 - 3.2. Influence des atomes de chlore.
 - 3.3. Les dérivés cyclisés.
 - 3.4. Relation structure-activité pour les acides hydroxamiques de la série aromatique.
4. PERSPECTIVES.

Première Partie

/ I N T R O D U C T I O N /

Première Partie :

INTRODUCTION.

1. METHODES D'ETUDE IN VITRO DU POUVOIR ANTIBACTERIEN.

1.1. Détermination de l'activité bactériostatique.

- 1.1.1. Méthode des dilutions en milieu liquide.
- 1.1.2. Méthode des dilutions en milieu solide.
- 1.1.3. Méthode par diffusion.

1.2. Détermination de l'activité bactéricide.

- 1.2.1. Les techniques utilisant les porte-germes.
- 1.2.2. Les techniques utilisant des suspensions de germes -.

- 1.2.2.1. La mesure du coefficient phénol.
- 1.2.2.2. Les méthodes utilisant des suspensions sans détermination du coefficient phénol.

1.2.2.2.1. Le "capacity use dilution test"

1.2.2.2.2. Tests visant à éliminer le produit résiduel.

- a) dilution suffisante du prélèvement mis en subculture.
- b) neutralisation du produit.
- c) méthode de centrifugations et de lavages.
- d) méthode utilisant les membranes filtrantes.

2. BUTS DE TRAVAIL.

1. - METHODES D'ETUDE IN VITRO DU POUVOIR ANTIBACTERIEN

Les techniques proposées pour l'étude de l'activité antibactérienne in vitro sont très nombreuses et elles explorent soit l'action bactériostatique, soit le pouvoir bactéricide. La première (action bactériostatique) traduit une inhibition temporaire de la prolifération des bactéries, tant que dure le contact avec l'agent inhibiteur. La seconde (activité bactéricide) indique une destruction définitive de la vitalité des bactéries, et elle seule assure la désinfection ou l'antisepsie.

1.1. DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE -

Le principe de la mesure de l'activité bactériostatique consiste à déterminer la plus faible concentration de la substance - ou sa plus forte dilution - capable d'inhiber la multiplication des bactéries placées dans des conditions optimales. Des méthodes par dilution, en milieu liquide, ou en milieu solide, et des méthodes par diffusion sont utilisables.

1.1.1. Méthode des dilutions en milieu liquide :

Des dilutions croissantes du produit essayé sont effectuées dans une série de tubes contenant un milieu de culture favorable à la bactérie étudiée. Les tubes de chaque série sontensemencés avec une quantité déterminée de suspension bactérienne dont on connaît la teneur en germes. Chaque série effectuée ainsi correspond à l'étude d'une souche bactérienne déterminée. Les milieux sont mis à incuber à 37° et sont examinés chaque jour pendant une semaine. La concentration de la substance étudiée se trouvant dans le premier tube ne présentant pas de culture visible après incubation de 24 h. constitue la concentration minimale inhibitrice.

Il est également possible de mesurer la concentration donnant 50% d'inhibition (RAKHIT-1973).

Les dilutions de la substance antibactérienne sont en général établies par entraînement selon une progression géométrique de raison 2, mais il est également possible, dans certains cas, de réaliser une gamme de dilutions plus serrées sans entraînement, ce qui permet d'obtenir des résultats plus précis. (CHABBERT-1963- LELUAN-1971).

Cette technique de dilution en milieu liquide est longue, et surtout adaptée aux déterminations isolées. Elle est cependant encore souvent utilisée. (KITAGAWA-1973- MISIEK-1973- LELUAN-1971- KAHAN-1974- HAQUE-1975).

Notons également qu'il est possible de pratiquer des repiquages, soit pour échapper à la trop forte turbidité occasionnée par certains produits (précipitation d'huile essentielle) soit pour rechercher des microorganismes survivants dans les tubes ne présentant pas de développement visible après incubation. Dans ces deux cas, nous déterminons une concentration minimale bactéricide.

1.1.2. Méthode des dilutions en milieu solide :

Le principe de cette méthode est identique au précédent, mais dans ce cas, les différentes concentrations du produit à étudier sont réalisées en milieu nutritif gélosé, maintenu en surfusion au bain-marie à 45°, puis coulé en boîte de Pétri. Après séchage à l'étuve, la surface du milieu de culture estensemencée en stries à l'aide d'une anse de platine préalablement plongée dans la suspension des différentes souches à essayer, dont on connaît la teneur en germes.

Plusieurs stries peuvent ainsi être réalisées sur une gélose en boîte de Pétri. La lecture est effectuée comme précédemment, chaque jour pendant une semaine d'incubation à 37°, et la concentration minimale inhibitrice du produit est la plus faible concentration du produit qui inhibe la croissance bactérienne au niveau de la strie.

Les avantages de cette technique sont nombreux :

- l'essai est rapide, il peut porter simultanément sur un grand nombre de souches bactériennes, et n'exige que de faibles quantités du produit à étudier.
- la lecture des résultats est plus nuancée que dans les méthodes en milieu liquide.

En effet, en milieu liquide, il s'agit de noter l'absence ou la présence de culture, alors qu'en milieu solide, trois cas peuvent se présenter :

- pas de culture,
- culture identique au témoin,
- présence de quelques colonies sur la strie d'ensemencement, et ce dernier cas permet éventuellement, en pratique, l'utilisation de la concentration inhibitrice partielle.

Enfin, des études comparatives des différentes méthodes de détermination de la C.M.I. semblent montrer que cette technique est la plus sensible et la plus sûre. (JOURDAN -1972- DESBORDES -1973).

Tout ceci fait que cette technique est largement utilisée pour la détermination de l'activité bactériostatique d'antiseptiques, ou d'antibiotiques (AKERBLOM -1973- JUNGERMANN -1971- SCHROTTER -1974) ou de différentes séries de produits chimiques de synthèses (BERES -1974- NAKAO -1974- SAEKI -1974- FERRES -1974- PESSON -1975- I et II HAQUE -1974).

Pour des études systématiques sur un grand nombre de souches, l'ensemencement des suspensions bactériennes peut être fait à l'aide d'un ensemenceur à sites multiples (ANNEAR 1974).

1.1.3. Méthodes par diffusion :

On dépose en plusieurs points sur un milieu gélosé, ensemencé en surface avec le germe témoin, des cylindres creux; ou des capsules, ou encore des disques de papier filtre, contenant les diverses dilutions du produit à étudier. Par diffusion, il se crée un gradient de concentration, et le diamètre de la zone d'inhibition est d'autant plus grand que la quantité de produit déposée est importante.

Cette technique est couramment utilisée pour doser les antibiotiques, et l'effet du produit à titrer sera comparé à celui d'une gamme standard. La relation entre la dose et la réponse est en général une relation linéaire entre le diamètre de la zone d'inhibition et le logarithme de la concentration en produit au niveau de la source.

Dans des conditions définies de milieu et d'inoculum, chaque produit possède une constante de diffusion qui lui est propre. Cette technique n'est donc applicable qu'aux produits qui possèdent une constante de diffusion suffisante, et elle est dans ce cas largement utilisée en pratique courante, en tenant compte des paramètres importants, tels que le milieu de culture, l'inoculum et la source de produit.

Cependant, lorsqu'un produit nouveau (antibiotique) apparait, l'utilisation d'une technique de diffusion nécessite un important travail d'étude, qui va consister à établir une courbe de concordance entre les concentrations minimales inhibitrices et les zones d'inhibition, puis à étudier un mode de lecture, son interprétation basée sur une définition de la sensibilité et de la résistance donnée par les propriétés pharmacologiques du produit, et son effet clinique .
(CHABBERT 1963).

Ces méthodes de diffusion sont employées en dehors de l'antibiogramme pour l'étude du pouvoir bactériostatique de préparations galéniques (recherche du pouvoir inhibiteur intrinsèque. J.O. 1973), pour rechercher la présence d'un produit antibactérien dans les liquides biologiques d'un animal d'expérience, pour l'étude des synergies et des antagonismes (QUESNEL 1974 BASTIANINI -1975-) et pour la recherche du pouvoir bactériostatique de substances chimiques de synthèses.
(SOHARIA -1973- JUNGERMANN -1971- RITZERFELD -1974).

1.2. DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE -

Cette détermination consiste à rechercher la plus faible concentration de la substance antibactérienne qui a tué la totalité des bactéries mises à son contact, en un temps donné dans un milieu connu.

Pour l'A.F.N.O.R., on entend par bactéricide un produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies (si le produit ou le procédé est sélectif, ceci doit être précisé).

Cette même norme A.F.N.O.R. T 72-IOI (antiseptiques et désinfectants - vocabulaire) entend par détermination de l'activité bactéricide d'un antiseptique ou d'un désinfectant, la détermination de la concentration minimale à laquelle ce produit est capable de réduire d'au moins 10^5 fois le nombre de cellules vivantes appartenant à des souches déterminées de 5 espèces bactériennes, en 5 minutes de contact.

La détermination de l'activité bactéricide peut se faire selon deux grands groupes de méthodes : celles qui utilisent les porte-germes, et celles des suspensions.

1.2.1. Les techniques utilisant les porte-germes :

Ces techniques ont pour objet de se rapprocher le plus possible des conditions d'utilisation pratique des antiseptiques. Elles consistent à immerger dans des solutions de la substance à étudier des objets inertes sur lesquels ont été fixées des bactéries. Après un temps de contact donné, ces objets sont retirés de la solution antibactérienne, puis transportés dans un milieu de subculture pour assurer le développement des bactéries ayant survécu.

Le point important est qu'il est nécessaire avant le transport dans le milieu de subculture, de traiter de manière appropriée les objets porte-germes afin de les débarrasser de la substance antibactérienne qu'ils ont pu entraîner. De très nombreux procédés ont été proposés, tous à base d'inactivateurs ou de lavages successifs. D'autre part, la nature des porte-germes utilisés diffère le plus souvent d'un auteur à l'autre, mais aucun procédé ne fait aujourd'hui l'unanimité.

C'est Robert KOCH qui en 1861 fut le premier à proposer une technique fondée sur l'utilisation des porte-germes. Des fils de soie imprégnés de spores de *BACILLUS anthracis* étaient plongés pendant un temps donné dans la solution désinfectante, et ensuite, transférés dans un milieu nutritif, ou parfois insérés sous la peau d'un animal, afin de déterminer à quelle concentration du produit les spores avaient été tuées. Cette technique fut ensuite adaptée à la détermination de l'activité des désinfectants, sur des bactéries non sporulées, telles que *SALMONELLA typhi* et *ESCHERICHIA coli* (DULONG DE ROSNAY -1974).

En 1897, KRONIG et PAUL proposèrent une modification de la méthode de KOCH, dans laquelle les germes étaient séchés sur des grenats de BOHEME, au lieu d'être posés sur un fil de soie.

Ces auteurs précisèrent par ailleurs que la mort des germes n'est pas instantanée, et que c'est un processus régulier et mesurable. Puis les porte-germes les plus variés ont pu être utilisés, comme des fragments de verre, des morceaux de corne, ou de batiște, des lames de verre, des papiers filtre ou papier Whatmann, des anneaux ou des cylindres de verre. Un document récent donne une liste indicative des porte-germes qui peuvent être utilisés et qui sont : des disques de papier Chardin, ou de papier Ducroux, des lames de verre pour bactériologie, des bandes de tissu de coton pur, non apprêté, des morceaux de bois debout, non traité, des bandes de plastique polyéthylène, des feuilles de papier aluminium, des carreaux de faïence (A.F.N.O.R. Doc 42 - 1975).

Dans cette dernière proposition de technique, afin d'éliminer au maximum le désinfectant, les suspensions bactériennes sont filtrées sur membrane après contact avec le produit, et sont rincées. Puis les membranes et les supports sont mis à incuber sur un milieu gélosé afin de dénombrer les colonies obtenues.

Toutes ces techniques sont intéressantes, car elles ont pour but de se placer dans des circonstances d'essais rappelant autant que possible les conditions pratiques d'utilisation du produit, mais elles ont de nombreux inconvénients, en particulier celui de mettre en essai une quantité inconnue de bactéries.

Cependant, ces techniques sont encore utilisées.

1.2.2. Les techniques utilisant des suspensions de germes- :

Elles consistent en général à mettre en contact durant des intervalles de temps variables, des dilutions croissantes de la substance à étudier, avec un nombre déterminé de bactéries en suspension dans un milieu déterminé. Une partie aliquote du mélange est ensuite transportée dans ou sur un milieu de subculture.

L'expression des résultats peut être donnée soit en valeur relative, par rapport à un produit étalon, et c'est la détermination classique du coefficient phénol, soit en valeur absolue et ce sont les méthodes des suspensions sans détermination du coefficient phénol.

1.2.2.1. La mesure du coefficient phénol :

Elle est réalisable principalement selon trois tests :

Le test de RIDEAL et WALKER (1903) représente la première tentative de standardisation de l'action des antiseptiques. Il utilise une seule souche bactérienne, *SALMONELLA typhi* et un temps de contact court (5 minutes) avec les dilutions de l'antiseptique. On note, après subculture de 48 h la présence ou l'absence de pousse microbienne, et le coefficient phénol est le rapport entre les dilutions de désinfectant et de phénol qui donnent le même effet bactéricide.

Dans le test de CHICK et MARTIN, le protocole est le même, mais on ajoute au milieu de contact, des fèces humaines préalablement stérilisées.

De nombreuses autres variantes ont été proposées (LAMBIN 1933) dont la plus récente paraît être la technique de l'A.O.A.C. (U.S. Association of Agricultural Chemists) proposée en 1960. Cette méthode laisse le choix entre trois milieux de culture, et deux germes, *SALMONELLA typhi* et *STAPHYLOCOCCUS aureus*. Le milieu de culture dépend du désinfectant étudié. C'est également une méthode en deux temps qui combine une technique de suspension et une technique de porte-germes.

Les techniques utilisant le phénol comme antiseptique de référence ont été critiquées. Tout d'abord, parce que la méthode prévue originellement pour tester des dérivés phénoliques, a été étendue à de nombreux antiseptiques et désinfectants. En effet, la détermination du coefficient phénol n'a de valeur que pour l'étude des phénols, ou des composés chimiquement voisins. (LELUAN -1972- VALLON -1972-).

Par ailleurs, le choix de *SALMONELLA typhi* comme germe test n'est pas très heureux, et des études statistiques ont montré des variations importantes du coefficient phénol dans des conditions expérimentales identiques. Toutes ces raisons font que ces techniques sont de moins en moins utilisées.

1.2.2.2. Les méthodes utilisant des suspensions sans détermination du coefficient phénol :

Les techniques utilisables sont extrêmement nombreuses, mais toutes comportent :

- dans un premier temps; un contact entre la substance et le germe,
- dans un second temps; une mise en subculture des bactéries traitées qui permettra de juger de la vitalité des germes.

On évalue le plus souvent l'activité bactéricide en recherchant dans des conditions expérimentales rigoureusement précisées, la concentration qui détruit 100% des germes. Il est cependant considéré actuellement comme préférable l'évaluation de 99,9% ou 99,99% de mortalité. Les récentes normes A.F.N.O.R. (T72-I50 et I5I, 1974) déterminent la concentration minimale à laquelle le produit est capable de réduire d'au moins 10^5 fois le nombre de cellules vivantes mises en essai. Parfois, on détermine, en présence d'une concentration donnée, le temps de contact bactéries - substance nécessaire à la destruction de la totalité, de 99,9% (JORDAN 1944) ou de 50% de germes présents.

1.2.2.2.1. Le capacity use dilution test :

Les différentes concentrations du produit (au moins trois) sont inoculées trois fois avec 1 ml d'une suspension bactérienne contenant entre 10^8 et 10^9 germes par ml. Le temps de contact est de 8 minutes à la température du laboratoire (20° - 22°) et les microorganismes mis en essai sont *PSEUDOMONAS aeruginosa*, *STAPHYLOCOCCUS aureus* et *PROTEUS vulgaris*. Une goutte du mélange est repiquée dans cinq tubes de milieu liquide de subculture, ou bien sur cinq boîtes de Pétri de gélose nutritive. Les milieux sont mis à incuber à 32° pendant 48 h, puis on note le nombre de tubes présentant un développement microbien, ou le nombre de colonies apparues sur les boîtes de milieu gélifié (KELSEY 1965).

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions d'utilisation, les antiseptiques peuvent être testés dans des milieux additionnés de sérum de cheval, ou de suspension de levures (KESLEY et SYKES 1965).

L'interprétation des résultats se fait de la façon suivante : aucune pousse de microorganisme test dans deux ou plus des cinq milieux liquides de subcultures après la seconde addition de germes signifie que le produit est satisfaisant pour l'utilisation à la concentration initiale utilisée dans le test. Il faut cependant répéter plusieurs fois ce test, et calculer une réponse moyenne pour chaque dilution de désinfectant employée (KESLEY -1969- BERGAN -1971-).

Cette technique est rapide et ne nécessite pas de matériel important. Cependant, on transporte toujours dans le milieu de subculture un peu de produit, en même temps que les germes traités.

Afin d'éviter la cause d'erreur, due à une éventuelle action bactériostatique du produit ainsi introduit, plusieurs solutions ont été proposées et nous allons les envisager dans le chapitre suivant. Néanmoins, cette méthode des suspensions est parfaitement valable dans un certain nombre de cas :

- évaluation de l'activité bactéricide de certains antiseptiques dont l'activité est inhibée par les matières organiques du bouillon nutritif de subculture, et pour les produits dont la concentration bactéricide en 15 minutes en eau distillée, est inférieure ou égale à dix fois la concentration bactériostatique (LAMBIN -1972- 1 et 2, LELUAN -1972-).

- évaluation de l'activité bactéricide des antibiotiques dérivée de la méthode des suspensions, proposée pour l'étude des associations d'antibiotiques (CHABBERT -1963-).

1.2.2.2.2. Tests visant à éliminer le produit résiduel :

Les principales modifications proposées en vue d'éliminer le plus possible l'influence de l'antiseptique dans le milieu de subculture sont : la dilution suffisante du prélèvement mis en sub culture, la neutralisation de l'antiseptique en essai, et le lavage des germes traités avant leur subculture, en ayant recours soit à la technique par centrifugation, soit à la technique par filtration sur membrane.

a) dilution suffisante du prélèvement mis en
subculture -

Cela peut être réalisé soit en augmentant le volume du milieu, soit en effectuant des dilutions successives de la partie aliquote prélevée dans plusieurs milieux de subculture. Ces procédés ne sont pas parfaits, sont peu pratiques en raison de grandes quantités de milieu nécessaires et pour cela sont peu utilisés.

b) neutralisation du produit -

Dans ces techniques, le mélange bactéries - substances à étudier est placé dans un milieu contenant un produit inactivant la substance, avant d'être mis en subculture. Les subcultures peuvent être réalisées en milieu solide (A.F.N.O.R. T 72 - I50) ou en milieu solide et en bouillon (CREMIEUX 1975 GREBUS 1973).

L'essai proprement dit doit toujours comporter des essais préliminaires destinés à vérifier l'efficacité du neutralisant choisi et son innocuité sur les bactéries mises en essai. Pour ce faire, les suspensions bactériennes, contenant 10^8 germes/ml (A.F.N.O.R.) ou 10^7 germes/ml (CREMIEUX 1975) sont mises en contact pendant un temps donné, égal à celui utilisé dans l'essai proprement dit, avec différents mélanges comprenant le neutralisant et le produit à essayer à la concentration maximale.

Puis, par subculture sur milieu gélosé, on réalise les dénombrements des colonies dans ces mélanges après ce contact, ainsi que dans une série témoin réalisée dans les mêmes conditions, mais comprenant un égal volume d'eau distillée stérile, à la place du produit (Mc BRIDE 1974 - NORTON 1974).

Cette technique ne demande pas d'appareillage particulier, cependant, elle est longue et délicate, car le neutralisant à utiliser est fonction du produit étudié, et des souches bactériennes.

En ce qui concerne le produit étudié, on ne connaît pas son inactivant spécifique en dehors de rares cas comme le thiosulfate de sodium à 0,5% pour les dérivés chlorés (hypochlorite, chloramine T) et les sels de métaux (cobalt, fer, zinc) pour les antiseptiques chélateurs des ions métalliques (dérivés du sulfate de 8 hydroxyquinoléine. C'est pourquoi, on est amené à essayer une série de mélanges complexes (voir liste des neutralisants) à base de Tween 80, de jaune d'oeuf, ou de lécithine dans la plupart des cas. Pour les produits à base d'organo mercuriels, et les produits contenant d'autres métaux lourds, le neutralisant le plus souvent préconisé est le thioglycolate de sodium à 0,5% ou 0,05%. Cependant, des réserves ont été émises sur son emploi (LELUAN 1972) et dans certains cas, ce milieu dépasse le but poursuivi.

En effet, les dérivés mercuriels se fixent sur la bactérie et le thioglycolate neutralise non seulement l'antiseptique transporté en excès, mais encore inactive le dérivé mercuriel fixé sur la bactérie, et permet de revivifier les bactéries qui, en son absence, seraient sans doute mortes à plus ou moins longue échéance.

La nature des souches bactériennes influence également la capacité de neutralisation d'un produit. En effet, des travaux effectués en particulier sur les ammoniums quaternaires (CREMIEUX 1975) ont montré que le choix d'un neutralisant de l'activité bactéricide, ne peut se faire qu'à la suite d'un travail préliminaire important, incluant plusieurs espèces bactériennes. Ces travaux montrent que l'espèce bactérienne considérée a plus d'importance que l'antiseptique dans la neutralisation, et confirment que ce phénomène de neutralisation est très complexe, et qu'il implique non seulement une réaction entre antiseptique et neutralisant, mais encore la participation d'éléments provenant de la cellule microbienne. A l'heure actuelle, nous ne connaissons rien de cette interaction, et cela représente sûrement la principale critique de cette méthode, en dehors de l'important travail qu'elle nécessite.

c) méthode de centrifugations et de lavages -

Toujours afin d'éliminer l'erreur due à l'activité bactériostatique résiduelle de l'antiseptique dans les milieux de subculture, une technique comportant centrifugations et lavages successifs à l'eau distillée stérile des bactéries a été proposée. (LAMBIN 1933). Le matériel nécessaire à l'exécution de cette technique comporte essentiellement une centrifugeuse réfrigérée, car une élévation de température est néfaste à la marche de l'essai (SAID 1959), et un dispositif de pompe à vide pour l'aspiration des liquides surnageants. Il faut effectuer au moins trois lavages à l'eau distillée stérile.

Cette technique, plus longue que la méthode des suspensions classiques, est parfaitement applicable à l'étude de toutes les substances antibactériennes autres que les organomercuriels. Ces derniers, en effet, se fixent sur les bactéries pour exercer leur action léthale, et les bactéries mortes sédimenteront plus vite que les survivantes lors de la centrifugation. Il existe des pertes inévitables de bactéries, lors des lavages des germes, et elles se feront de préférence à l'égard des germes se trouvant à la partie supérieure du culot, donc les plus légers, autrement dit les survivants. Ce nombre de survivants étant minime pour certaines concentrations des dérivés organomercuriels, ce seront ceux-là même que les lavages aspireront, rendant ainsi la subculture négative, et faussant le résultat de l'essai.

d) méthode utilisant les membranes filtrantes -

Les membranes filtrantes sont utilisées depuis une vingtaine d'années, et de nombreux auteurs ont souligné leur intérêt pour l'étude de substances antibactériennes (LAMBIN 1962 - 1963 - 1964, LELUAN 1971 - 1972, DULONG DE ROSNAY 1974, CLUZEL 1973, LAMBIN 1971 - 1 et 2, CREMIEUX 1973, PRINCE 1975).

Cette technique consiste à filtrer sur membranes filtrantes stériles montées dans un appareillage approprié, la suspension bactérienne préalablement soumise à l'action d'un désinfectant soluble dans l'eau, et à laver soigneusement les germes retenus sur ces membranes. Les membranes sont ensuite, soit introduites dans des tubes de milieu liquide à large diamètre, et l'on mesurera alors une concentration bactéricide totale, soit déposées à la surface de milieux gélosés qui peuvent contenir un neutralisant, et l'on pourra alors dénombrer les survivants.

Cette technique de filtration sur membrane est applicable à toutes les substances antibactériennes solubles dans l'eau, et c'est la seule utilisable pour l'étude du pouvoir bactéricide des organomercuriels (LELUAN 1972). Elle peut être considérée comme une méthode de référence, et a été en France, l'objet d'une normalisation récente (Norme A.F.N.O.R. T 72 - I51 - 1974).

Pour avoir une répartition uniforme des colonies sur la membrane, il convient de porter la prise d'essai dans un certain volume d'eau, 10 ml (CLUZEL 1973) ou 50 ml (A.F.N.O.R. T 72 I51), déjà déposé sur la membrane.

Les membranes filtrantes présentent dans certains cas des propriétés adsorbantes à l'égard de certaines substances antibactériennes (LAMBIN 1972 - 2, LELUAN 1972). Les substances adsorbées sont élevées dans le milieu de subculture, et provoquent, si leur quantité est importante, une action bactériostatique résiduelle sur les germes survivants. Le phénomène est plus important si la membrane est déposée sur un milieu gélosé en vue d'une numération de germes.

Pour réduire l'importance de ce phénomène, il faut surtout réduire le plus possible le temps de contact de la solution bactéricide avec la membrane et pratiquer des lavages abondants avec au moins 200 ml d'eau distillée stérile ou de diluant approprié (eau physiologique tryptonée - A.F.N.O.R. T 72 - I51).

Dans tous les cas, on peut s'assurer facilement de l'existence (ou de l'absence) de ce phénomène en pratiquant deux sortes d'essais.

On peut opérer une nouvelle filtration d'une suspension contenant environ 10^4 germes/ml d'une souche sensible à de faibles doses d'antiseptiques sur une ou plusieurs membranes pour lesquelles aucune ou quelques colonies seulement sont apparues après incubation. On vérifie le lendemain, après incubation, que le germe ait poussé dans des proportions comparables à celles du même germe incubé dans les mêmes conditions sur une membrane neuve (CLUZEL 1973).

Cette manière de procéder nous apparaît critiquable, tout d'abord, parce qu'il faut posséder une souche suffisamment sensible à de faibles doses de produit, ensuite et surtout parce que le produit éventuellement adsorbé sur la membrane aura pu diffuser dans le milieu gélosé lors de l'incubation. C'est pourquoi, il nous apparaît préférable d'effectuer un essai préliminaire, pour définir les conditions expérimentales, de la façon suivante (A.F.N.O.R. T 72 ISI 1974). Les suspensions bactériennes d'essai sont filtrées sur des membranes ayant préalablement reçu le produit à la concentration maximale et rincées afin d'éliminer au maximum le produit. Après incubation des membranes sur milieu gélosé, on effectue le dénombrement des colonies par comparaison à une série témoin, réalisée dans les mêmes conditions, mais sans filtration préalable du produit.

Lorsque les résultats de ce dénombrement sont différents, cela signifie qu'il reste sur la membrane filtrante une quantité suffisante de produit pour provoquer la bactériostase. Il convient alors de renouveler l'essai, en augmentant le nombre de lavages, ou le volume de l'eau utilisée pour chacun d'eux, et éventuellement d'introduire dans le milieu de dénombrement un neutralisant approprié.

En procédant ainsi, on dispose d'une technique largement applicable, sûre, reproductible, et qui peut, sans aucun doute, être considérée comme une technique de référence pour la détermination du pouvoir bactéricide des substances antibactériennes. Elle est peut être plus longue et nécessite un matériel important, mais elle permet de déterminer des concentrations bactéricides partielles du produit étudié, ce qui est préférable à la détermination de concentrations bactéricides totales.

Nous avons schématiquement décrit les principales méthodes d'étude du pouvoir antibactérien in vitro et il faut aussi rappeler l'importance de différents paramètres qui interviennent dans tous les cas. Ces facteurs sont : le milieu de culture et le milieu dans lequel se fait l'étude de l'activité bactéricide; la bactérie par son âge et son état, sa nature, la densité de l'inoculum, et enfin la substance à étudier par sa solubilité et le solvant utilisé.

Il existe d'autres techniques d'étude utilisables comme l'évaluation de l'effet bactéricide par néphélométrie, des tests étudiant le mode d'action de la substance sur la cellule microbienne, des tests d'inhibition enzymatique, des tests d'activité sporicide et enfin des tests d'étude in vivo uniquement, ou mixtes in vivo - in vitro. En effet, dans aucun autre domaine de la microbiologie appliquée, n'existe peut être une aussi grande multitude de techniques proposées. C'est pourquoi, il faut se féliciter de l'effort de normalisation et de standardisation entrepris dès 1903 par RIDEAL et WALKER et poursuivi dans de nombreux pays en ce qui concerne les techniques (A.F.N.O.R. SOCIETE ALLEMAND, BRITISH STANDARD, SOCIETE SUISSE, A.O.A.C. U.S. etc...) et également le vocabulaire employé dans ce domaine (PATTERSON 1932, REDDISH 1959, SYKES 1965, A.F.N.O.R. T 72 - 100, etc...).

- Tableau I -

LISTE NON LIMITATIVE DE NEUTRALISANTS

(A.F.N.O.R. T 72 I50, CREMIEUX 1975, DULONG DE ROSNAY 1974, BERGAM 1972)

Produits antibactériens	Neutralisants
Produits phéniques	- jaune d'oeuf frais dilué 5% - préparation à 3% polysorbate 80, 0,3% lécithine et 0,4% de lauryl sulfate de sodium. - préparation à 5% de jaune d'oeuf frais et 4% de polysorbate 80. - préparation à 7% Lubrol W 2% lécithine 4% polysorbate 80. - préparation à 4% Lubrol W et 4% lécithine.
Aldéhydes	- préparation contenant 3% polysorbate 80 0,3% lécithine et 0,1 de l. histidine. - sulfite de soude.
Ammoniums quaternaires et chlorhexidine et dérivés	- jaune d'oeuf frais dilué à 5%. - préparation à 5% jaune d'oeuf et 3% polysorbate 80. - préparation à 3% polysorbate 80 et 0,3% lécithine. - préparation à 3% Lubrol W et 2% lécithine. - savons. - préparation à 10% phospholipides à 50 mg/ml.
Dérivés halogénés	- Thiosulfate de sodium à 0,5%.
Composés mercuriels et produits contenant autres métaux lourds	- thioglycolate de Na à 0,05% ou 0,5%. - L. cystéine à 0,08% ou 0,15%.

- Tableau II -

CLASSIFICATION DES METHODES D'ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN IN VITRO

/ 1.1. DETERMINATION DU POUVOIR BACTERIOSTATIQUE /

- 1.1.1. Dilution en milieu solide (détermination de la C.M.I.)
- 1.1.2. Dilution en milieu liquide (C.M.I., repiquages : CMB)
- 1.1.3. Diffusion en milieu solide (
 - (cupules
 - (disques Diatrose ou Gauthier)

/ 1.2. DETERMINATION DU POUVOIR BACTERICIDE /

1.2.1. Méthodes utilisant des porte-germes.

- (RIDAL - WALKER 1903
- (CHICK - MARTIN 1938
- (AOAC 1960
- { 1.2.2.1. Coefficient phénol

- (1.2.2.2.1. "capacity use
- (dilution test"
- (
- (
- (
- (
- (
- { 1.2.2.2. Sans coefficient phénol

- (1.2.2.2.2. Suppression de
- (l'effet du produit
- (résiduel :
- (

- a) dilutions
- b) neutralisations
- c) centrifugations
- d) filtration sur
- membrane.

1.2.2. Méthodes des suspensions

2. - BUTS DE TRAVAIL

Tous les jours, les laboratoires de synthèse organique fabriquent des molécules nouvelles, et ces molécules sont ensuite testées afin de leur trouver une éventuelle activité pharmacologique. Le Laboratoire de Chimie Organique de Monsieur le Professeur DAUDON s'est penché sur la synthèse des acides hydroxamiques, et nous avons recherché par deux méthodes simples de criblage l'action in vitro de ces produits à la fois sur des bactéries et sur des champignons inférieurs.

En tenant compte des possibilités de synthèse d'une part, et des résultats des tests d'activités antimicrobiennes in vitro d'autre part, toute une série d'acides hydroxamiques a été étudiée, dans le double but de diminuer les concentrations minimales actives, et d'élargir le spectre d'activité.

Ces méthodes de base nous permirent de sélectionner des dérivés intéressants, pour lesquels des tests complémentaires devaient être faits. Ayant trouvé pour ces dérivés des concentrations minimales inhibitrices, relativement intéressantes, il était important de rechercher ensuite un éventuel pouvoir bactéricide, et de le définir avec précision.

Disposant par ailleurs d'un nombre assez important de molécules dans cette série d'acides hydroxamiques, nous avons cherché à dégager certaines relations structure - activité antimicrobienne.

Ce travail devait nous permettre également de nous familiariser avec des techniques récentes et originales pour certaines d'entre elles, et nous serons amené à discuter la valeur des différentes méthodes utilisées, et à justifier leur choix parmi les nombreuses méthodes d'études in vitro du pouvoir antimicrobien.

Enfin, signalons que la réalisation de ce travail est due à l'étroite collaboration qui s'est établie entre le laboratoire de Chimie Organique II, et le laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique, au sein de l'Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques de Lyon.

Deuxième Partie

/ RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UNE /

/ SERIE D'ACIDES HYDROXAMIQUES /

Deuxième Partie :

RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UNE SERIE D'ACIDES HYDROXAMIQUES.

1. MATERIEL ET METHODES.

1.1. Produits testés.

1.1.1. Synthèse des dérivés étudiés.

1.1.2. Préparation des solutions mères.

1.2. Etude de l'activité bactériostatique au biophotomètre enregistreur.

1.2.1. Souches bactériennes.

1.2.2. Appareillage.

1.2.3. Technique d'étude - exemple de protocole
expérimental.

1.3. Etude de l'activité fungistatique.

1.3.1. Souches mycéliennes.

- . levures
- . moisissures
- . dermatophytes

1.3.2. Technique d'étude.

2. RESULTATS.

2.1. Activité bactériostatique.

- . courbe de croissance
- . inhibition
- . ralentissement

2.2. Activité fungistatique.

- . CMI

2.3. Produits retenus ayant une activité intéressante.

1. - MATERIEL ET METHODES

1.1. PRODUITS TESTES -

1.1.1. Synthèse des dérivés étudiés : (*)

1.1.1.1. Méthodes générales :

- Acides monohydroxamiques -

Produits n°s 11 et 21.

Ces acides hydroxamiques sont formés par action d'une solution méthanolique d'hydroxylamine base sur les esters éthyliques des acides carboxyliques correspondants, selon la méthode décrite dans Organic Synthesis (1943 a).

- Acides N hydroxy carbamoyl carboxyliques -

Produits n°s 9, 10, 13, 16, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35.

Les composés monohydroxamiques sont obtenus à partir des anhydrides internes des diacides correspondants par action d'une solution méthanolique d'hydroxylamine base, en relation stoechiométrique, à la température du bain de glace. Les anhydrides internes sont eux-mêmes formés par déshydratation des diacides vicinaux au moyen de l'anhydride acétique ou du chlorure d'acétyle, suivant le protocole décrit dans Organic Synthesis (1943 b).

Protocole opératoire général :

a) formation de la fonction anhydride.

O,1 mole du diacide est chauffé lentement dans O,2 mole d'anhydride acétique jusqu'à dissolution. Le chauffage est maintenu 10 minutes supplémentaires.

(*) le protocole détaillé de ces synthèses, ainsi que les caractéristiques spectroscopiques des produits formés, fait l'objet d'une publication particulière.

Par refroidissement, on observe la cristallisation de l'anhydride formé qui est isolé par filtration, lavé plusieurs fois par petites fractions d'éther, et séché au four quelques minutes. L'anhydride est utilisé directement pour la préparation du dérivé monohydroxamique selon Organic Synthesis (1943 a).

Rendement (Rt) compris entre 60 et 80%.

b) formation du dérivé monohydroxamique.

- préparation de la solution méthanolique d'hydroxylamine base -

On dissout dans un erlen :

- . 0,1 mole de chlorhydrate d'hydroxylamine par agitation à chaud dans 30 ml de méthanol pour analyse..
- . 0,1 mole de potasse en pastille dans 15 ml de méthanol pour analyse.

Les deux solutions refroidies sont mélangées en agitant dans un bécher à la température du bain de glace. On maintient à 0°C pour assurer la précipitation complète du chlorure de potassium.

On filtre alors rapidement sur büchner, lave le précipité de KCl avec quelques millilitres de méthanol glacé.

- formation du dérivé monohydroxamique -

Dans un bécher équipé pour une agitation magnétique et plongé dans un bain glace-sel, on laisse refroidir la solution d'hydroxylamine base à une température inférieure à - 10°C. On ajoute alors par petites portions à la spatule 0,1 mole d'anhydride d'acide préparé antérieurement, en réglant la vitesse d'addition sur la vitesse de dissolution de l'anhydride dans la solution d'hydroxylamine.

La température interne du milieu réactionnel ne doit pas dépasser 0°C au cours de cette opération. L'agitation est maintenue environ 60 à 90 minutes. On isole selon les cas le dérivé monohydroxamique :

- . par filtration lorsque celui-ci est insoluble.
- . par précipitation au moyen de l'éther éthylique ou de l'acétate d'éthyle dans les autres cas.

Les produits obtenus peuvent être recristallisés dans leur solution méthanolique par évaporation lente au réfrigérateur. La formation du dérivé monohydroxamique peut être suivie par le test au perchlorure de fer à 5% : coloration rouge bordeaux.

- N hydroxy dicarboximide -

Produits n°s 1, 4, 8, 2, 7, 24, 26.

La formation de cette fonction est assurée par déshydratation interne à partir des dérivés mono hydroxamiques du diacide. Dans la plupart des cas, cette déshydratation s'effectue spontanément par simple chauffage en milieu aqueux du dérivé hydroxamique. La réaction est suivie par la négativation du test au perchlorure de fer. L'acide N hydroxy carbamoyl carboxylique est mis en solution dans un léger excès d'eau. L'ébullition de cette solution entraîne la formation de la N hydroxy dicarboximide, qui est isolée après refroidissement par filtration ou par évaporation..

1.1.1.2. Méthodes particulières :

- Composé I9 -

Ce composé est formé par action de la diméthyl hydrazine asymétrique sur l'anhydride phtalique à chaud en solution méthanolique.

- Composé 20 -

Il est formé par action de la N méthyl hydroxylamine sur l'anhydride phtalique en solution éthanolique à chaud.

- Composé 24 -

Ce dérivé est formé par action de l'hydroxylamine base (0,3 mole) sur le dichlorure de l'acide ortho sulfobenzoïque.

- Composés 15 et 18 -

Ces deux dérivés sont formés par action de l'hydroxylamine base sur l'anhydride mixte résultant de l'action des acides correspondants (terephthorique et ortho - iodobenzoïque) sur le chloroformiate d'éthyle en présence de triéthylamine.

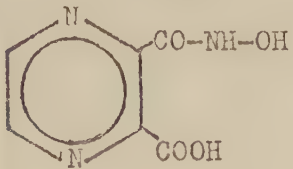
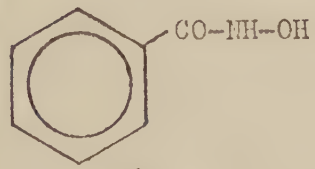
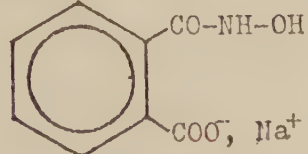
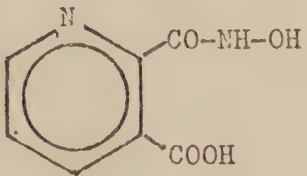
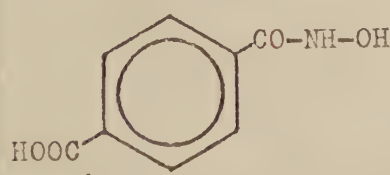
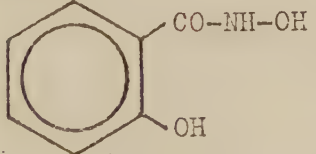
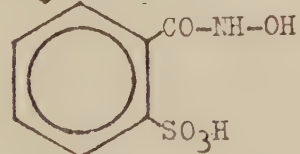
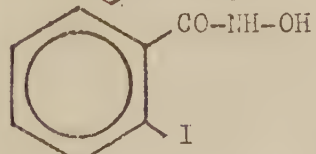
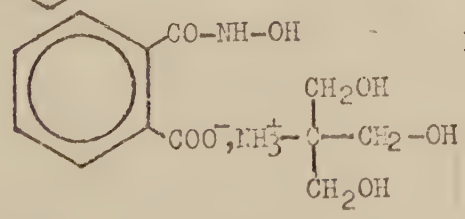
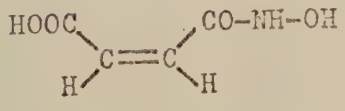
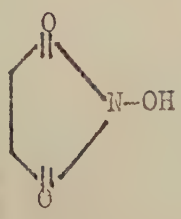
1.1.2. Préparation des solutions mères :

Tous les dérivés étudiés nous étaient remis sous forme de poudre cristallisée et nous avons préparé des solutions mères à 10^{-3} mole par litre (M/l) ou 10^{-2} M/l selon les cas, en eau distillée ou en solvant (diméthylsulfoxyde, diméthylformamide ou propylène glycol). Toutes les solutions ont été stérilisées par filtration sur membrane et chaque fois qu'un solvant organique a été utilisé pour dissoudre le produit, nous avons fait, lors de nos essais, des témoins avec le même solvant organique aux mêmes concentrations.

ACIDES HYDROXAMIQUES TESTES

P.M. Molécule brute	Formule développée	Nom chimique
179 $C_9H_9NO_3$		N-hydroxy cis-norbornène-5 endodicarboximide-2,3
250 $C_9H_9NO_3Cl_2$		Dichloro-5,6 cis-norbornane-endodicarboximide-2,3
195 $C_{10}H_{13}NO_3$		N hydroxy diméthyl-4,5 cis-cyclohexène-4 dicarboximide-1,2
163 $C_{15}H_5NO_3$		N-hydroxyphtalimide
185 $C_{14}H_4NO_3Na$		Sel sodique du N-hydroxyphtalimide
248 $C_{10}H_4N_2O_6$		N,N' dihydroxy benzène tétra carboximide-1,2,4,5
190 $C_{10}H_{10}N_2O_2$		N diméthylamino phtalimide
177 $C_7H_7NO_3$		N-méthyl-3 dioxo-1,4 benzoxazine-2,3
75 $C_5H_5NO_2$		Acide acétohydroxamique
181 $C_7H_5NO_4$		Acide N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque (Acide orthophtalique monohydroxamique)

ACIDES HYDROXAMIQUES TESTES

F.M.	Formule brute	Formule développée	Nom chimique
183	$5N_3O_4$		Acide N hydroxy carbamoyl-3 pyrazine-2 carboxylique
137	$7NO_2$		Acide benzo hydroxamique
203	$6NO_4Na$		Sel monosodique de l'acide N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque
182	$6N_2O_4$		Mélange des isomères : • Acide N hydroxy carbamoyl-2 pyridine carboxylique-3 et • Acide N hydroxy carbamoyl-3 pyridine carboxylique-2
181	$17NO_4$		Acide N hydroxy carbamoyl-4 benzoïque (acide téréphtalique monohydroxamique)
153	$17NO_3$		Acide 2 hydroxy benzo hydroxamique (acide salicyl hydroxamique)
217	$17NO_5S$		Acide N hydroxy carbamoyl-2 benzène sulfonique
263	$6H_6IO_2$		Acide iodo-2 benzo hydroxamique
301	$2H_{18}N_2O_7$		N hydroxy carbamoyl-2 benzoate (de trihydroxy méthyl amino méthane)
131	$5H_5NO_4$		Acide malléique monohydroxamique (acide N hydroxy carbamoyl-3 cispropène-2 oïque)
115	$5H_5NO_3$		N hydroxysuccinimide

ACIDES HYDROXAMIQUES TESTES

P.M.	Formule développée	Nom chimique
ivé oufré cyclisé 5 NO ₅ 4		N hydroxy imide-1,2 sulfobenzofique (N hydroxy saccharine)
247 H ₅ N ₃ O ₅		N hydroxy dicarboximide-6,7 phthalazine dione-1,4
225 7 NO ₆		Acide N hydroxycarbamoyl-3 benzène dicarboxylique-1,2
225 7 NO ₆		Mélange des isomères : - Acide N hydroxy carbamoyl-4 benzène dicarboxylique-1,3 - Acide N hydroxy carbamoyl-3 benzène dicarboxylique-1,4
308 H ₈ N ₄ O ₇		Mélange des isomères : - Acide carbamoyl-2 N hydroxy carbamoyl-7 dioxo-1,4 phthalazine carboxylique-6 - Acide carbamoyl-2 N hydroxy carbamoyl-6 dioxo-1,4 phthalazine carboxylique-7
324 H ₈ N ₄ O ₆ S		Mélange des isomères : - Acide thiocarbamoyl-2 N hydroxy carbamoyl-7 dioxo-1,4 phthalazine carboxylique-7 - Acide thiocarbamoyl-2 N hydroxy carbamoyl-6 dioxo-1,4 phthalazine carboxylique-7
250 H ₆ N ₂ O ₆		Acide N hydroxy carbamoyl-2 dicarboximido-4,5 benzoïque
284 H ₈ N ₂ O ₈		Mélange des isomères : - Acide di N hydroxy carbamoyl-2,5 benzène dicarboxylique-1,4 - Acide di N hydroxy carbamoyl-2,4 benzène dicarboxylique-1,5
196 H ₈ N ₂ O ₄		Mélange des isomères : - Acide amino-4 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque - Acide amino-5 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque
238 H ₁₀ N ₂ O ₅		Mélange des isomères : - Acide acétylamino-4 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque - Acide acétylamino-5 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque
309 H ₁₅ N ₁ O ₇		Mélange des isomères : - Acide (tétra hydro pyran-2-yl)oxycarbonyl-4 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque - Acide (tétra hydro pyran-2-yl)oxycarbonyl-5 N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque

1.2. ETUDE DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE AU BIOPHOTOMETRE ENREGISTREUR -

1.2.1. Souches bactériennes :

Les trois souches bactériennes retenues pour ces recherches d'une activité bactériostatique sont :

- . *ESCHERICHIA coli*
- . *STAPHYLOCOCCUS aureus*
- . *PSEUDOMONAS aeruginosa* (*)

Les caractères tinctoriaux, cultureux et biochimiques des souches sont vérifiés périodiquement. Elles sont conservées sur gélose ordinaire à +4° ou bien lyophilisées à la température du laboratoire. Elles ne présentent pas de résistance particulière aux antibiotiques.

1.2.2. Appareillage :

Les courbes de croissance ont été réalisées sur biophotomètre enregistreur de BONNET-MAURY et JOUAN. Le principe de cet appareil est le suivant :

- un faisceau lumineux provenant d'une forte lampe ponctuelle est envoyé simultanément sur chacune des six cuves de cultures placées dans une enceinte thermostatique. A la sortie de chaque cuve, le faisceau lumineux vient frapper une des six cellules à couche d'arrêt situées derrière les cuves.
- un galvanomètre enregistreur à six courbes (de couleurs différentes) est commuté automatiquement toutes les vingt secondes d'une cellule sur la suivante. Six diaphragmes, placés devant chacune des cuves, permettent le réglage indépendant de l'intensité traversant celles-ci (LAMBIN 1969, DUCHENE 1961).

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutiques, Professeur Maurice CARRAZ.

1.2.3. Technique d'étude - exemple de protocole expérimental :

- Préparation des cuves -

Le jour précédent l'essai, on place dans chaque cuve, 8 ml de bouillon nutritif ordinaire (B.O.) et 1 ml de la solution du produit à étudier ou 1 ml d'eau distillée stérile pour réaliser un témoin de la croissance. Les cuves sont ensuite incubées 18 heures à 37°, pour contrôle de stérilité.

- Inoculation des cuves -

Les cuves sont inoculées à l'aide de 1 ml d'une dilution au 1/1000 en eau physiologique stérile, d'une culture de germes de 18 h à 37° en B.O. Ceci correspond toujours à une quantité finale de germes dans les cuves allant de 10^4 à 10^6 germes par ml au début de l'essai.

- Mise en route de l'essai -

L'appareil est mis en marche puis, après une heure environ, la température étant alors stabilisée, les cuves sont placées dans l'enceinte thermostatique. Les courbes sont enregistrées en pourcentage de transmission (T%), l'agitation est modérée et la température est de 37°.

Après avoir réglé le 100% de transmission, pour chaque cuve, à l'aide du diaphragme correspondant, l'appareil est commuté sur enregistrement automatique.

Lorsque nous observons une inhibition de pousse dans une au moins des six cuves, nous laissons l'appareil fonctionner environ 24 h, puis la ou les cuves qui ne présentent pas de développement microbien sont mises à l'étuve à 37° pendant une semaine pour rechercher la prolongation éventuelle de l'effet bactériostatique.

Le tableau de la page 33 donne un exemple de protocole expérimental.

- Préparation des dilutions à tester -

dilution	A	B	C	D	E
produit solution ère à 10^{-2} M/l	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
au distillée stérile	0	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
concentration n M/l	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-4}$

- Préparation des cuves -

cuve	1	2	3	4	5	6
bouillon ordinaire	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml
Eau distillée stérile	1 ml					
1 ml de dilution		A	B	C	D	E

Incubation 18 h à 37°

Dilution de germes	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
concentration finale	0	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$

1.3. ETUDE DE L'ACTIVITE FUNGISTATIQUE -

1.3.1. Souches mycéliennes :

Pour l'étude de l'activité fungistatique, nous avons retenu 15 souches mycéliennes, représentant un assez large éventail des principales espèces de champignons inférieurs rencontrés en pathologie médicale. Ces souches ont été classées en trois groupes :

- . LEVURES
- . MOISSURES
- . DERMATOPHYTES

Elles proviennent toutes du laboratoire de Mycologie et de Microbiologie Industrielle de l'Institut Pasteur de Lyon et sont toutes récentes et d'origine humaine.

Levures :

Sept souches de levures anascosporées identifiées en accord avec LODDER (1970) ont été testées : *CANDIDA albicans*, *CANDIDA tropicalis*, *CANDIDA pseudotropicalis*, *CANDIDA krusei*, *CANDIDA parapsilosis*, *TORULOPSIS glabrata*, *GEOTRICHUM candidum*. Nous avons également testé une souche de levure formant des ascospores *SACCHAROMYCES cerevisiae*.

Ces souches sont conservées sur gélose-conservation (*), à la température du laboratoire et leurs caractères morphologiques, physiologiques et métaboliques sont vérifiés périodiquement. Elles ne présentent pas de résistance particulière à la Nystatine, à l'Amphotéricine B ni à la Pimaricine.

(*) Gélose-conservation - Institut Pasteur de Lyon.

Moisissures et dermatophytes :

ASPERGILLUS fumigatus, ASPERGILLUS niger, ASPERGILLUS versicolor et PENICILLIUM glaucum représentent les quatre souches de moisissures testées. Pour les dermatophytes, nous avons retenu une espèce des trois principaux genres en pathologie humaine : MICROSPORUM canis, TRICHOPHYTON mentagrophytes et EPIDERMOPHYTON floccosum.

Ces souches ont été identifiées en accord principalement avec SEGRETAIN (1964) et VANBREUSEGHEM (1966); elles sont conservées à la température du laboratoire sur gélose Sabouraud (*), sont repiquées et vérifiées périodiquement.

1.3.2. Technique d'étude :

Pour la recherche de l'activité fungistatique de cette série d'acides hydroxamiques, nous avons utilisé la méthode classique de dilution en milieu solide, Pour chaque substance, une gamme de dilutions géométriques de raison 2 est réalisée en eau distillée à partir de la solution mère. Puis, 2 ml de chaque dilution sont incorporés dans 18 ml de gélose Sabouraud, maintenue à 45° en surfusion et exempte de pouvoir neutralisant, et coulée en boîte de Pétri.

Après solidification, les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve pour assurer le séchage de la surface du milieu de culture.

(*) Gélose Sabouraud - Institut Pasteur de Lyon.

Inoculation :

Pour les levures, l'inoculum consiste en une strie, à l'anse de platine calibrée, d'une suspension du microorganisme contenant environ 10^5 cellules par millilitre.

Pour les moisissures et les dermatophytes, on ensemence des fragments de cultures fraîchement entretenues.

Incubation et lecture :

Les milieux ensemencés sont placés à l'étuve à 28° dans tous les cas. Des lectures sont effectuées à 2, 3 et 5 jours pour les levures, à 2, 5 et 7 jours pour les moisissures et à 8, 15 et 21 jours pour les dermatophytes. Dans tous les cas, des témoins de croissance sont réalisés, soit en eau distillée, soit en solvant, aux mêmes concentrations, et l'on détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la plus faible concentration finale de la substance étudiée provoquant une inhibition totale de la croissance du microorganisme.

2. - RESULTATS

2.1. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE -

Les courbes de croissance, enregistrées au biophotomètre de BONNET MAURY nous permettent de déterminer :

- des concentrations bactériostatiques en mole par litre (M/l) qui sont les concentrations des produits provoquant une inhibition totale de la pousse pendant 18 à 24 heures. Dans ce cas, il n'y a pas de variation du T% et le tracé obtenu est linéaire et parallèle à l'axe des heures (abscisses).
- des concentrations qui provoquent un allongement de la phase apparente de latence, c'est-à-dire un décalage de 1 à plusieurs heures de la phase exponentielle de croissance par rapport à la courbe témoin.
- des concentrations qui ne provoquent ni bactériostase, ni allongement de la phase apparente de latence. Dans ce cas, les courbes de croissance sont pratiquement confondues avec la courbe témoin.

Un exemple de ces résultats est donné par la figure 2 pour l'action du produit 2D sur *ESCHERICHIA coli* :
à 8.10^{-4} M/l, le produit est bactériostatique vis-à-vis de ce microorganisme puisque le tracé reste plat pendant 24 heures, alors que la croissance est tout à fait normale pour la cuve témoin.

- . à $0,5 \cdot 10^{-4}$ M/l, le produit n'a pratiquement plus d'activité puisque le tracé est presque confondu avec celui de la courbe témoin.
- . pour des concentrations intermédiaires, l'allongement de la phase de latence est respectivement de 2 heures à 10^{-4} M/l, 5 à 6 heures à $2 \cdot 10^{-4}$ M/l et de 13 à 14 heures à $4 \cdot 10^{-4}$ M/l.

Les résultats (tableau IV) montrent tout d'abord une série de produits qui ne présentent pas d'activité aux concentrations étudiées vis-à-vis des trois germes testés : *ESCHERICHIA coli*, *STAPHYLOCOCCUS aureus* et *PSEUDOMONAS aeruginosa*. Ce sont les produits 8D, 5D, 7D, 19D, 20D, 11D, 12D, 13D, 18D, 15D, 14D, 24D, 29D, 34D, 35D.

Pour une deuxième série de composés, on observe - à certaines concentrations - une augmentation de la phase apparente de latence pour un ou plusieurs germes, mais aucun effet bactériostatique aux concentrations étudiées : produits 1D, 10D, 22D, 17D, 30D, 31D, 32D et 33D, 26D, 27D.

Enfin, certains acides hydroxamiques sont bactériostatiques sur au moins un des trois germes tests : 4D, 2D, 21D, 9D, 23D et 16D. Le produit 28D fait la transition entre ces deux dernières séries de composés, car il n'est pas bactériostatique à 10^{-3} M/l pour *ESCHERICHIA coli* et *PSEUDOMONAS aeruginosa*, et il a un pouvoir bactériostatique limite à cette concentration pour *STAPHYLOCOCCUS aureus* qui pousse après 18 heures d'inhibition.

Parmi cette dernière série de produits bactériostatiques, le produit 4D (homologue dichloré du produit 1D) à une concentration voisine de 10^{-3} M/l, est bactériostatique vis-à-vis de la souche d'*ESCHERICHIA coli* alors que son homologue non chloré 1D présente seulement une faible augmentation de la phase de latence apparente à cette concentration (figure 1). Ces deux produits 4D et 1D, qui appartiennent à la série alicyclique, n'ont aucune activité à 8.10^{-4} M/l sur *STAPHYLOCOCCUS aureus* ni sur *PSEUDOMONAS aeruginosa*.

Dans la série aromatique, le dérivé cyclisé 2D est bactériostatique à 8.10^{-4} M/l vis-à-vis d'*ESCHERICHIA coli* (figure 2) et vis-à-vis de *STAPHYLOCOCCUS aureus* à 4.10^{-4} M/l (figure 3). Il reste cependant inactif à une concentration voisine de 10^{-3} M/l sur *PSEUDOMONAS aeruginosa* (figure 6).

Dans cette même série, le dérivé à cycle ouvert 9D, qui est l'homologue du produit 2D après ouverture du cycle et addition de HOH, présente la même activité sur *ESCHERICHIA coli* (bactériostase à 10^{-3} M/l) (figure 9) et sur *STAPHYLOCOCCUS aureus* (bactériostase à 5.10^{-4} M/l) (figure 4) que le dérivé 2D, et montre de plus une activité bactériostatique intéressante sur le bacille pyocyanique à 10^{-3} M/l (figure 7).

Deux autres composés montrent une activité bactériostatique sur les trois germes tests :

- l'acide acétohydroxamique (21D) est bactériostatique à 10^{-3} M/l pour *ESCHERICHIA coli* (figure 10) et *PSEUDOMONAS aeruginosa* (figure 8) et à 5.10^{-4} M/l pour *STAPHYLOCOCCUS aureus* (figure 5).

- l'acide malléique monohydroxamique (16D) est bactériostatique à des concentrations de 10^{-3} M/l ou un peu supérieures (Tableau IV) vis-à-vis des trois microorganismes.

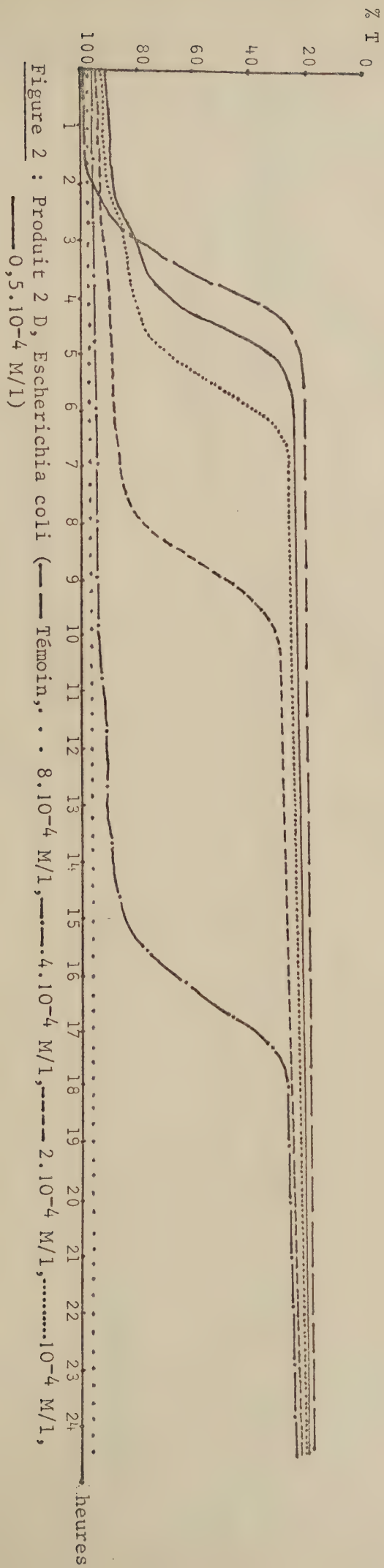
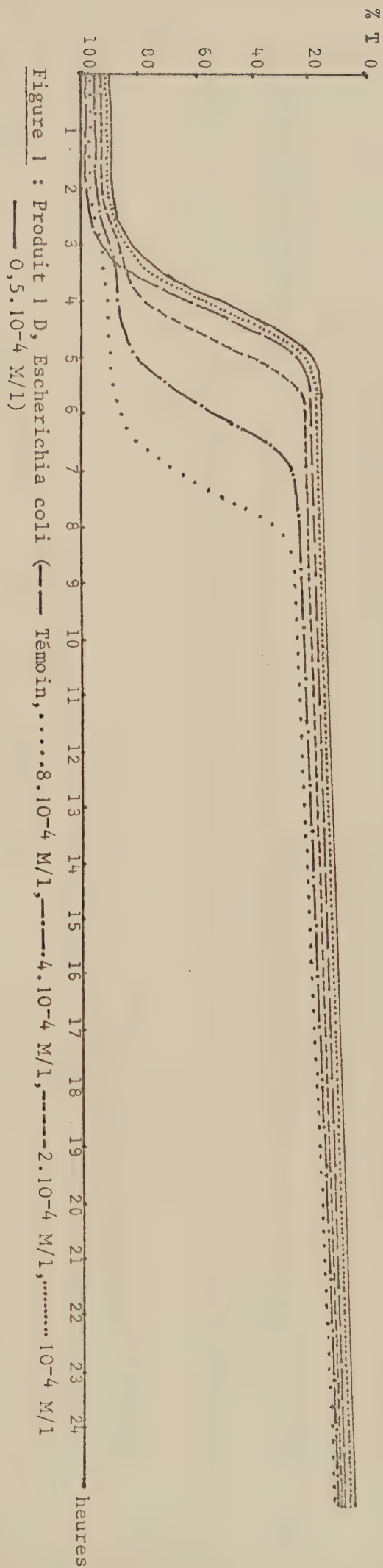
Quant à l'acide N hydroxy carbamoyl -2 benzène sulfonique (23D) , analogue au 9D avec substitution de la fonction acide carboxylique par une fonction acide sulfonique, il est bactériostatique pour *ESCHERICHIA coli* et *STAPHYLOCOCCUS aureus* à 10^{-2} M/l et présente une inhibition de 14 heures de la croissance de *PSEUDOMONAS aeruginosa* à cette concentration. Ce dernier produit possède donc une activité environ dix fois plus faible que celle des dérivés 9D, 16D, et 21D.

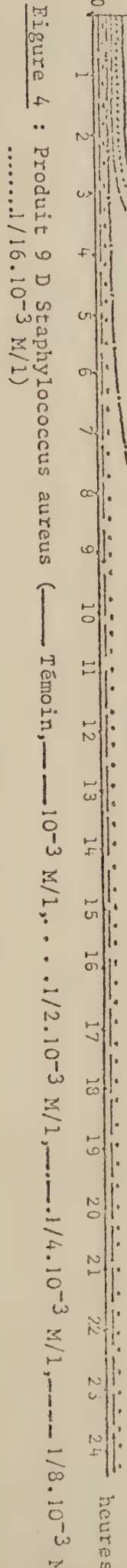
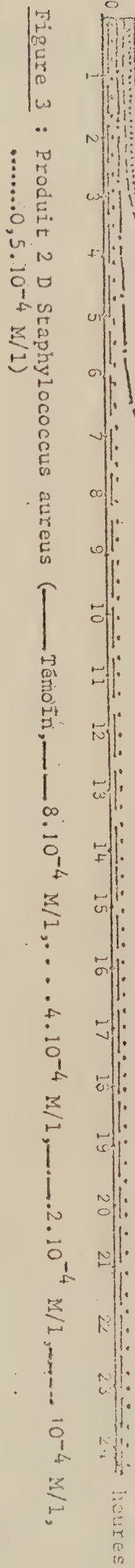
2.2. ACTIVITE FUNGISTATIQUE -

Les résultats de l'activité fungistatique des dérivés hydroxamiques sont rassemblés dans le tableau V. Aucun des composés ne présente une fungistase sur l'ensemble des souches de levures, moisissures et dermatophytes testés et la plupart des produits sont totalement inactifs sur les champignons à 10^{-3} M/l.

L'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) est inactif sur les levures et les *ASPERGILLI* mais est bactériostatique à $5 \cdot 10^{-4}$ M/l vis-à-vis des dermatophytes et de *PENICILLIUM glaucum*.

L'acide benzo hydroxamique (11D), homologue du produit précédent mais sans fonction acide carboxylique, présente la même activité sur les dermatophytes et *PENICILLIUM glaucum* à une concentration de 10^{-3} M/l.





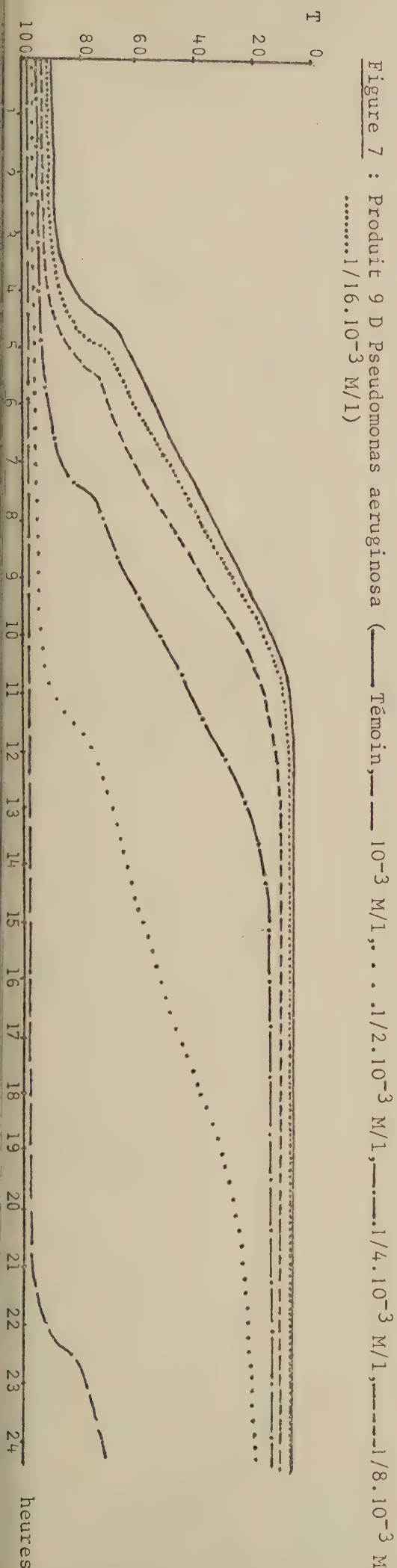
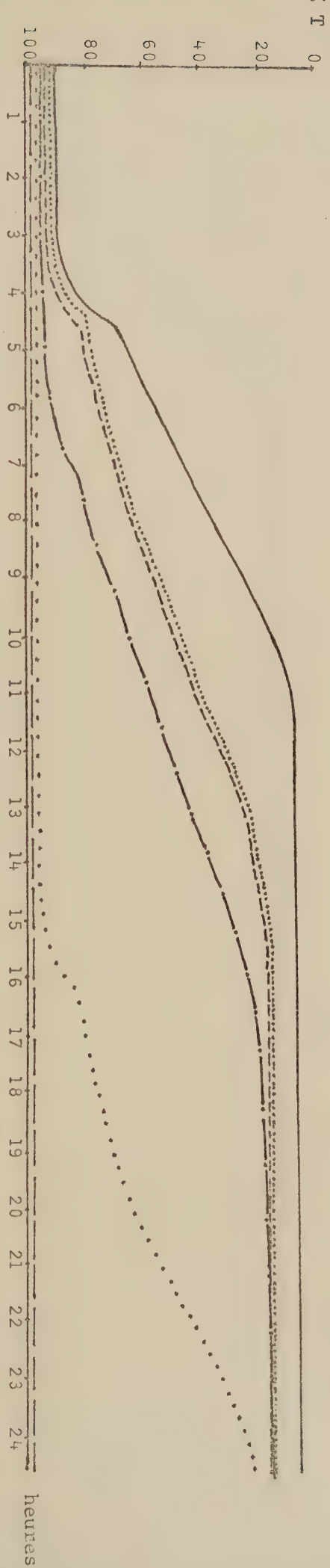
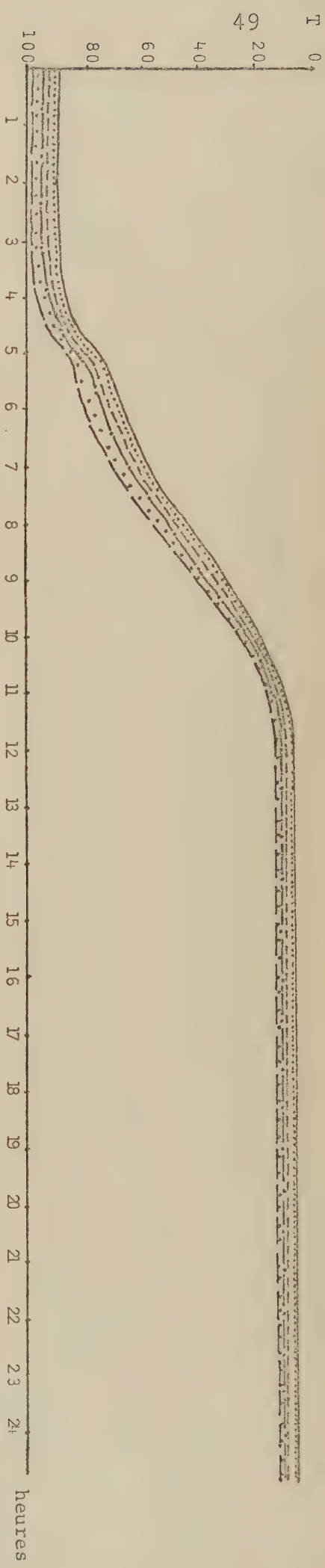


Figure 9 : Produit 9 D Escherichia coli (— Témoïn, — 10^{-3} M/l, . . . $1/2.10^{-3}$ M/l, - - - $1/4.10^{-3}$ M/l, - - - $1/8.10^{-3}$ M/l, $1/16.10^{-3}$ M/l)

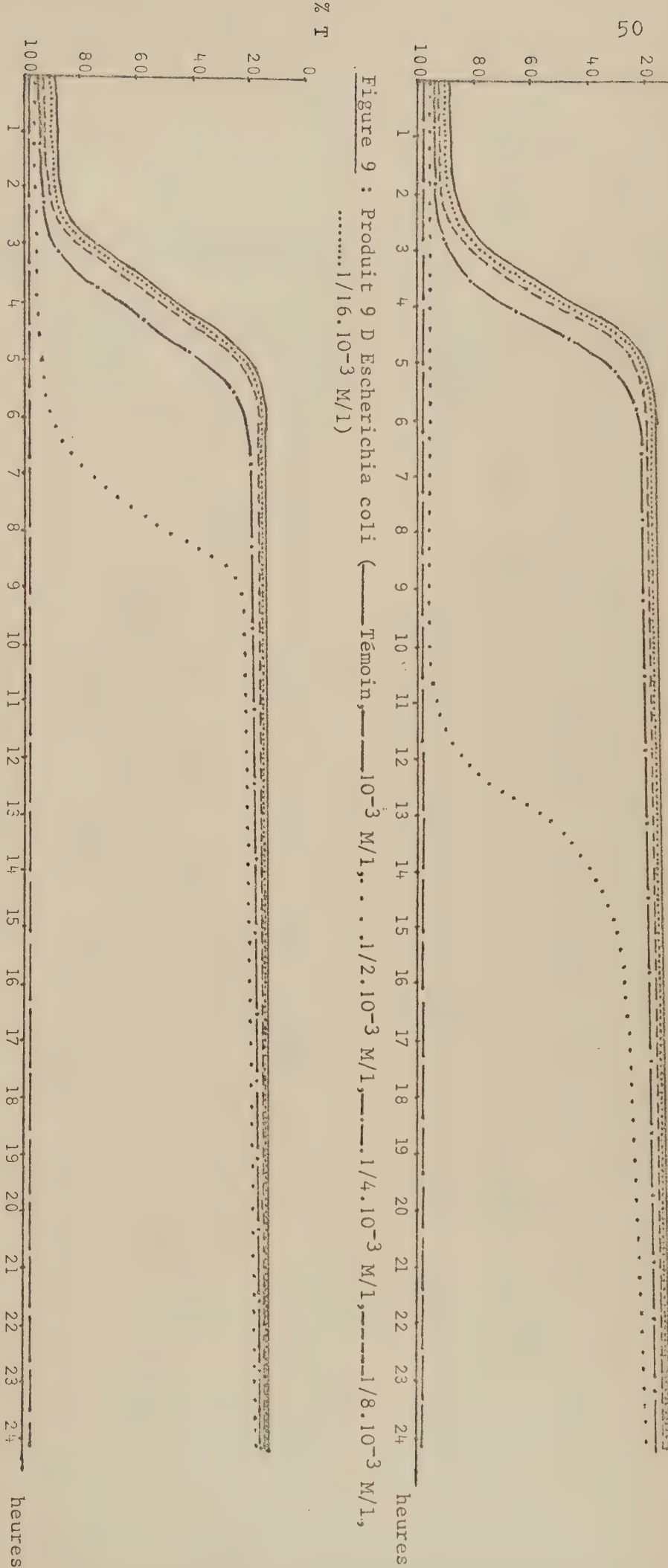


Figure 10 : Produit 21D Escherichia coli (concentrations idem figure 9)



Tableau IV : Activité antibactérienne au biophotomètre enregistreur

Escherichia coli		Staphylococcus aureus		Pseudomonas aeruginosa	
augmentation de la phase de latence	concentration bactériostatique en M/l	augmentation de la phase de latence	concentration bactériostatique en M/l	augmentation de la phase de latence	concentration bactériostatique en M/l
3 à 4 h à 8.10^{-4}	$> 8.10^{-4}$	inactif à 8.10^{-4}		inactif à 8.10^{-4}	
3 h à 10^{-4}	8.10^{-4}	inactif à 8.10^{-4}		inactif à 8.10^{-4}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
2 h à 10^{-4}	8.10^{-4}			inactif à 8.10^{-4}	
inactif à 10^{-2}		4 h à 2.10^{-4}	4.10^{-4}	inactif à 10^{-2}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-2}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
4 h à 5.10^{-4}	10^{-3}	5 h à $2,5.10^{-4}$	5.10^{-4}	7 h à 5.10^{-4}	10^{-3}
9 h à 5.10^{-4}	10^{-3}	5 h à $2,5.10^{-4}$	5.10^{-4}	3 h à $2,5.10^{-4}$	10^{-3}
3 h à 5.10^{-3}	$> 10^{-2}$	2 h à 5.10^{-3}	$> 10^{-2}$	1 h à 5.10^{-3}	$> 10^{-2}$
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
6 h à 5.10^{-3}	10^{-2}	6 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	1 à 2 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
inactif à 10^{-3}		12 h à 5.10^{-3}	10^{-2}	14 h à 10^{-2}	$> 10^{-2}$
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
12 h à 10^{-3}	$1,25.10^{-3}$	10 h à 10^{-3}	$1,25.10^{-3}$	3 h à $2,5.10^{-4}$	10^{-3}
4 h à 10^{-2}	$> 10^{-2}$	inactif à 10^{-2}		inactif à 10^{-2}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
10 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	7 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	14 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
4 à 5 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	1/2 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	4 à 5 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
8 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	18 h à 10^{-3}	10^{-3}	5 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		7 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	1 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
3 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	6 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	1 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		2 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
inactif à 10^{-3}		2 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$	1 h à 10^{-3}	$> 10^{-3}$
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	
inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}		inactif à 10^{-3}	

Tableau V : (suite)

Produits		21	9	10	11	12	13	18	22
Souches									
C. albicans		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
C. tropicalis		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
C. pseudotropicalis		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
C. krusei		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
C. parapsilosis		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
S. cerevisiae		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
T. flabrata		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
G. candidum		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
A. fumigatus		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
A. niger		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
A. versicolor		$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>5.10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
P. glaucum		$>10^{-3}$	5.10^{-4}	5.10^{-3}	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
M. canis		$>10^{-3}$	5.10^{-4}	$>5.10^{-3}$	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
Tr. mentagrophytes		$>10^{-3}$	5.10^{-4}	$2,5.10^{-3}$	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$
E. floccosum		$>10^{-3}$	5.10^{-4}	$2,5.10^{-3}$	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$

Tableau V : (suite)

souches	Produits									
	28	29	30	31	32	33	34	35		
C. albicans	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
C. tropicalis	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
C. pseudotropicalis	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
C. krusei	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
C. parapsilosis	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
S. cerevisiae	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
T. glabrata	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
G. candidum	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
A. fumigatus	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
A. niger	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
A. versicolor	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
P. glaucum	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
M. canis	$>10^{-3}$	10^{-3}	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
Tr. mentagrophytes	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		
E. floccosum	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	10^{-3}	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$	$>10^{-3}$		

2.3. PRODUITS RETENUS AYANT UNE ACTIVITE INTERESSANTE -

Des deux tests de sélection étudiés, la détermination de l'activité bactériostatique au biophotomètre enregistreur nous permet de choisir les produits intéressants, alors que - en dehors peut-être de l'acide orthophtalique monohydroxamique -9D- et de l'acide benzo hydroxamique (11D) - tous les acides hydroxamiques étudiés sont identiques en regard de leur activité fungistatique.

L'acide benzo hydroxamique (11D) est éliminé, car il ne présente pas d'activité vis-à-vis des bactéries à 10^{-3} M/l.

Trois produits seront retenus pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice par dilution en milieu solide, l'action sur des bactéries en phase exponentielle de croissance et la détermination de la concentration minimale bactéricide par filtration sur membrane :

- l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D), surtout en fonction de son action bactériostatique à 10^{-3} M/l vis-à-vis d'ESCHERICHIA coli et de PSEUDOMONAS aeruginosa, et à 5.10^{-4} M/l vis-à-vis de STAPHYLOCOCCUS aureus, et également en raison de sa faible activité fungistatique - notamment sur les dermatophytes -.
- l'acide malléique monohydroxamique (16D), qui est bactériostatique à $1,25.10^{-3}$ M/l vis-à-vis d'ESCHERICHIA coli et de STAPHYLOCOCCUS aureus et à 10^{-3} M/l vis-à-vis de PSEUDOMONAS aeruginosa.
- l'acide acétohydroxamique (21D) , qui présente la même activité bactériostatique que l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) sur les trois germes testés.

Troisième Partie

/ ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PRODUITS /

/ RETENUS /

Troisième Partie :

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PRODUITS RETENUS.

1. MATERIEL ET METHODES.

- 1.1. Produits étudiés.
- 1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par dilution en milieu solide.
 - 1.2.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.2.2. Technique d'étude.
- 1.3. Action sur des bactéries en phase exponentielle de croissance.
 - 1.3.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.3.2. Technique d'étude.
- 1.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) par filtration sur membrane.
 - 1.4.1. Microorganismes étudiés.
 - 1.4.2. Appareillage.
 - 1.4.3. Technique d'étude.

2. RESULTATS.

- 2.1. Concentrations minimales inhibitrices - CMI
- 2.2. Action sur les bactéries en phase exponentielle de croissance.
- 2.3. Concentrations minimales bactéricides - CMB

1. - MATERIEL ET METHODES

1.1. PRODUITS ETUDIES -

Seuls les produits qui ont montré une activité intéressante lors de l'étude de l'activité bactériostatique au biophotomètre enregistreur ont été retenus. En effet, l'ensemble de ces acides hydroxamiques n'a pas donné de résultats satisfaisants en ce qui concerne le pouvoir fungistatique.

Nous avons ainsi sélectionné trois dérivés dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau VI.

1.2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) PAR DILUTION EN MILIEU SOLIDE -

1.2.1. Microorganismes étudiés :

Le tableau VII rassemble les différentes bactéries étudiées. Elles comprennent trois souches de STAPHYLOCOCCUS aureus, STREPTOCOCCUS faecalis et ESCHERICHIA coli, une souche de PROTEUS vulgaris, SALMONELLA typhi, KLEBSIELLA pneumoniae, sept souches de SERRATIA et neuf souches de PSEUDOMONAS aeruginosa. Ce sont toutes des souches de collection en dehors des six souches de SERRATIA 1, 3, 6, 44, 52 et 60, qui ont été récemment isolées en milieu hospitalier.

Les caractères tinctoriaux, culturels, biochimiques et éventuellement antigéniques de ces souches sont vérifiés périodiquement. Elles sont conservées sur gélose ordinaire ou gélose trypticase soja à +4°, ou bien lyophilisées à la température du laboratoire.

Tableau VI: Caractéristiques des produits retenus

N°	Nom chimique	activité bactériostatique en M/l			activité fungistatique en M/l		
		E. coli	S. aureus	Ps. aeruginosa	levures	moisissures	dermatophytes
9 D	Acide N hydroxy carbamoyl-2 benzoïque (acide orthophtalique monohydroxamique)	10^{-3}	5.10^{-4}	10^{-3}	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	5.10^{-4}
16 D	Acide malléique monohydroxamique (acide N hydroxy carbamoyl-3 cispropène-2 oïque)	$1,25.10^{-3}$	$1,25.10^{-3}$	10^{-3}	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
21 D	Acide acétolhydroxamique	10^{-3}	5.10^{-4}	10^{-3}	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$

MICROORGANISMES ETUDIÉS

Cocci GRAM +	Staphylococcus aureus (*)		
	Staphylococcus aureus	IPL	9602
	Staphylococcus aureus	ATCC	6538
	Streptococcus faecalis	IPL	9
	Streptococcus faecalis	ATCC	10541
	Streptococcus faecalis	IPL	4740
Bacilles GRAM - Entérobactéries	Escherichia coli (*)		
	Escherichia coli	IPL	2750
	Escherichia coli	ATCC	10536
	Proteus vulgaris	IPL	411
	Salmonella typhi	IPL	7722
	Klebsiella pneumoniae	IPL	21
	Serratia marcescens	IPL	959I
	Serratia marcescens var. marcescens	S.	1
	Serratia liquefaciens	S.	3
	Serratia marcescens var. marcescens	S.	6
	Serratia rubidea	S.	44
	Serratia marcescens var. kiliensis	S.	52
	Serratia liquefaciens	S.	60
Bacilles GRAM - Pseudomonadaceae	Pseudomonas aeruginosa (*)		
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	22
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9543
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9541
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9539
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9542
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9547
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9548
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9550
	Pseudomonas aeruginosa	IPL	9556

(*) collection du laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique professeur Maurice CARRAZ.

IPL - Institut Pasteur de Lyon.

ATCC - American Type Culture Collection.

1.2.2. Technique d'étude :

- principe -

La substance à étudier est incorporée à diverses concentrations dans un milieu solide à la surface duquel se pratiquera l'ensemencement des souches bactériennes tests.

- dilution du produit -

On prépare une gamme de dilution du produit à étudier en eau distillée stérile, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations obtenues doivent être dix fois supérieures à celles que l'on désire obtenir après dilution en gélose.

- préparation des boîtes de Pétri -

Le milieu de culture est de la gélose nutritive Difco :

Nutrient Agar Difco	Extrait de viande	3 g
	peptone	5 g
	Agar	15 g
	Eau distillée	1000 ml

Stérilisation 121° - 15' - pH final $6,8 \pm 0,2$

Des flacons contenant 36 ml de gélose nutritive sont portés au bain-marie bouillant, jusqu'à fusion de la gélose, puis refroidis lentement jusqu'à une température de 45 à 50°. On ajoute alors 4 ml de la dilution antibactérienne choisie et, après un mélange soigneux, on coule en boîtes de Pétri stériles de diamètre 95 mm. Le pH du mélange substance-milieu de culture est auparavant vérifié et, éventuellement, réajusté à la neutralité avec une solution de NaOH N/10.

Cependant, dans la majorité des cas, le pouvoir tampon du milieu de culture suffit pour neutraliser l'acidité des solutions d'acides hydroxamiques étudiées, qui sont des acides faibles.

Pour chaque dilution, on prépare ainsi deux boîtes de Pétri, à raison de 20 ml du mélange gélose nutritive - dilution du produit par boîte; en effet, les essais sont toujours pratiqués en double exemplaire. Après solidification du milieu, les boîtes sont portées à l'étuve à 37°, de façon à sécher soigneusement la surface de la gélose et, si possible, les couvercles.

- Ensemencement des souches bactériennes -

Les souches bactériennes, conservées sur gélose ordinaire à +4°, sont entraînées par repiquage de 24 h à 37° sur gélose inclinée, puis 24 h à 37° en bouillon ordinaire (B.O.) Cette culture de 24 h en B.O. est diluée au 1/1000 en eau physiologique tryptonée.

Eau physiologique tryptonée

peptone trypsique de caséine	1,0 g
chlorure de sodium	8,5 g
eau distillée	1000 ml

Stérilisation 121° - 15' - pH final 7,2 ± 0,2

L'ensemencement est pratiqué sous forme de stries à la surface du milieu à l'aide d'une anse de platine. Des essais préliminaires ont montré que la dilution au 1/1000 d'une culture de 24 heures à 37° en Bouillon Ordinaire réalisait un inoculum provoquant l'apparition de colonies juste confluentes.

On ensemence ainsi deux boîtes de Pétri par dilution du produit à tester; et, pour chaque essai, deux boîtes de Pétri sans produit servant de témoins inoculum. Les milieux ensemencés sont incubés à l'étuve à 37°. Des lectures sont effectuées à 24 h, 48 h et 72 heures.

- Exemple de protocole expérimental - Produit à tester : 9D -

tubes	1	2	3	4	5	6	7
9D à 10 ⁻¹ M/l	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
eau stérile	-	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
concentration en M/l	10 ⁻¹	5.10 ⁻²	2,5.10 ⁻²	1,25.10 ⁻²	6,25.10 ⁻³	3,12.10 ⁻³	1,56.10 ⁻³

- Incorporer 4 ml de chaque dilution dans 35 ml de Nutrient Agar à 45°. Homogénéiser. Couler en boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher les boîtes.
- Ensemencer en stries une dilution 1/1000 d'une culture de 24 h en bouillon ordinaire de la souche à étudier. Pratiquer l'essai en double pour chaque dilution. Etuver à 37°.

boîtes	1	2	3	4	5	6	7
concentration finale en M/l	10 ⁻²	5.10 ⁻³	2,5.10 ⁻³	1,25.10 ⁻³	6,25.10 ⁻⁴	3,12.10 ⁻⁴	1,56.10 ⁻⁴

1.3. ACTION SUR DES BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE -

Nous recherchions, dans cette étude, le mode d'action des produits retenus (9D et 21D) sur les micro organismes et, en particulier, un éventuel effet bactéricide. En effet, l'addition, à des microorganismes en phase exponentielle de croissance, de produits antibactériens à différentes concentrations peut montrer soit un ralentissement du taux de croissance, soit une stabilisation du pourcentage de transmission (T%) et l'effet est alors bactériostatique, ou encore une augmentation du T% qui traduit un effet bactériolytique et ce dernier phénomène laisse supposer que le produit étudié sera bactéricide. Rappelons que le taux de croissance traduit le nombre de divisions par unité de temps et qu'il est d'autant plus grand que la durée d'une bipartition est plus courte (LAMBIN 1969).

1.3.1. Microorganismes étudiés :

Seule la souche d'ESCHERICHIA coli (*) a été utilisée pour cette étude. Les raisons qui ont guidé ce choix sont d'une part la reproductibilité des tracés obtenus dans les mêmes conditions opératoires au biophotomètre enregistreur, et, d'autre part, le taux de croissance élevé en phase exponentielle.

1.3.2. Technique d'étude :

Le protocole expérimental est identique à celui utilisé lors de la recherche de l'activité bactériostatique au biophotomètre enregistreur (1.2. Deuxième partie), sauf en ce qui concerne l'addition des solutions de substances à étudier qui sont alors ajoutées non pas avant l'enregistrement de la courbe mais pendant la phase exponentielle de croissance.

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique - Professeur Maurice CARRAZ -

Pour ce faire, les cuves sont préparées comme décrit précédemment en I.2.3. Deuxième Partie, placées dans l'appareil et l'enregistrement de la croissance commence. Lorsque le T% atteint la valeur 80, très rapidement on arrête l'enregistrement, on place dans chaque cuve 1 ml de la dilution du produit à tester ou 1 ml d'eau distillée stérile pour le témoin, puis on reprend l'enregistrement.

1.4. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE (CMB) PAR FILTRATION SUR MEMBRANE -

Pour la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB), nous avons utilisé une technique de filtration sur membrane voisine de celle utilisée par CLUZEL (1973) et de celle préconisée par l'AFNOR (Norme T72 151 1974) dont nous allons rappeler le principe.

La technique consiste à verser sur une membrane filtrante stérile le mélange bactéries - substance à étudier, après un temps de contact déterminé des bactéries avec la substance. Les bactéries sont retenues sur la membrane tandis que le produit est éliminé dans le filtrat. Plusieurs lavages successifs permettent d'éliminer la majeure partie du produit, toujours plus ou moins adsorbée sur la membrane. Cette dernière sera introduite dans un bouillon de subculture ou déposée à la surface d'un milieu gélosé.

1.4.1. Microorganismes étudiés :

Quatre souches de référence internationale ont été retenues :

- . *ESCHERICHIA coli* ATCC IO536
- . *PSEUDOMONAS aeruginosa* IPA 22
- . *STREPTOCOCCUS faecalis* ATCC IO541
- . *STAPHYLOCOCCUS aureus* ATCC 6538

Ces souches sont conservées sur gélose inclinée à +4° ou lyophilisées à la température du laboratoire, et leurs caractères cultureux, tinctoriaux, biochimiques et éventuellement antigéniques sont vérifiés périodiquement.

1.4.2. Appareillage :

L'appareillage de filtration est de type classique. Nous avons utilisé les modèles MILLIPORE :

- . appareils de filtration en acier inoxydable, diamètre 50 mm.
- . rampe de filtration à trois postes, avec supports filtres, en acier inoxydable, diamètre 50 mm.
- . pompe pour vide ou pression.
- . membranes filtrantes en nitrate de cellulose, à bords hydrophobes, diamètre 50 mm, porosité 0,45 μ m.

1.4.3. Technique d'étude :

Préparation des suspensions microbiennes :

Les souches sont entraînées par repiquages de 24 h à 37° sur gélose ordinaire. Les suspensions sont réalisées à partir du dernier tube, par dilution en eau physiologique tryptonée, de façon à obtenir un inoculum de l'ordre de 10^8 germes/ml,

Essais : -----

Une gamme de dilutions du produit à tester est réalisée en eau distillée stérile à partir de la solution mère et selon une progression géométrique de raison 2. L'inoculum bactérien est ensuite réparti dans des tubes à essais à raison de 2 ml par tube. On ajoute dans chaque tube 2 ml d'une dilution donnée de la substance, puis, après avoir soigneusement mélangé, on laisse en contact pendant 15 à 30 minutes au bain-marie à 22°. Le temps de contact écoulé, on prélève le plus rapidement possible 1 ml du mélange bactéries-substance et on le dépose stérilement sur la membrane (les membranes sont auparavant mises en place dans l'appareil de filtration et recouvertes de 10 ml d'eau distillée stérile de façon à assurer une répartition homogène de la prise d'essai sur la membrane).

On filtre immédiatement, puis on lave la membrane par quatre passages de 50 ml d'eau distillée stérile. La membrane est alors prélevée à l'aide de pinces stériles et déposée à la surface d'une gélose nutritive, en veillant à ce qu'elle adhère totalement à la gélose. Les géloses sont incubées à 37° et la lecture des résultats est effectuée après 24h et 72h.

Témoins : -----

Pour contrôler les expériences et les résultats, il faut réaliser un témoin inoculum et des témoins du lavage des bactéries et des membranes.

. Témoin inoculum

Pendant le temps de contact bactéries - substance, on réalise - à partir de l'inoculum - une gamme de dilutions au 1/10 par passages en eau physiologique tryptonée. Cinq tubes sont préparés, contenant théoriquement 1, 10, 10^2 , 10^3 et 10^4 germes/ml. On prélève 1 ml dans chaque tube, que l'on filtre sur membrane comme précédemment, puis les membranes sont déposées à la surface d'une gélose nutritive et portées à l'étuve à 37°. On pourra ainsi réaliser une numération de l'inoculum et exprimer les résultats en pourcentage de survivants.

. Témoins lavages

Pour chaque souche bactérienne, on effectue l'essai suivant :

1 ml de la solution la plus concentrée du produit à essayer est introduit dans l'appareil de filtration stérile contenant 10 ml d'eau distillée, puis filtré. La membrane est ensuite lavée trois fois avec 50 ml d'eau physiologique tryptonée. Puis, elle est recouverte une quatrième fois par 50 ml d'eau physiologique tryptonée auxquels on ajoute 1 ml de la suspension bactérienne contenant théoriquement 10^2 germes/ml. Après filtration, la membrane est déposée sur une gélose nutritive puis incubée comme précédemment.

L'essai est satisfaisant si le nombre de colonies obtenu est voisin de celui de la numération de la même suspension microbienne sans addition préalable de produit sur la membrane filtrante.

2. - RESULTATS

2.1. CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES - CMI -

Comme nous le rappelons dans notre introduction en 1.1., la concentration minimale inhibitrice d'une substance correspond à la plus faible concentration de la substance capable d'inhiber totalement la multiplication des bactéries après 24 heures d'incubation à 37°.

- Produit 9D acide orthophtalique monohydroxamique -

Les CMI reportées dans le tableau VIII sont de $1,25 \cdot 10^{-3}$ M/l pour la plupart des souches bactériennes testées, ce qui correspond à 226 mcg/ml. Les souches de *SERRATIA marcescens* var. *marcescens* S1 et S6 sont les plus résistantes, puisque les CMI sont de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l, soit 452 mcg/ml. Les souches les plus sensibles à l'action bactériostatique du 9D sont *ESCHERICHIA coli* (*) et *PSEUDOMONAS aeruginosa* (*) *STAPHYLOCOCCUS aureus* IPL 9602 et *SERRATIA rubidaea* S44 pour lesquelles les CMI sont de $0,63 \cdot 10^{-3}$ M/l, soit 113 mcg/ml. En définitive, pour l'ensemble des souches testées, les CMI vont de $0,63$ à $2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l.

- Produit 16D acide malleique monohydroxamique -

Les CMI sont de $1,25 \cdot 10^{-3}$ M/l, soit 162 mcg/ml pour 20 des 29 souches bactériennes testées (tableau IX). Les souches les plus résistantes ont des CMI de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l, c'est-à-dire 325 mcg/ml, et ce sont toutes les souches de *SERRATIA* - hormis *SERRATIA rubidaea* - et trois souches de *PSEUDOMONAS aeruginosa* (IPL 9542, IPL 9550, IPL 9556) parmi les dix souches étudiées.

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique - Professeur Maurice CARRAZ -

- Produit 21D acide acétohydroxamique -

L'ensemble des CMI , pour ce dernier produit, est compris entre $0,63 \cdot 10^{-3}$ M/l et $5 \cdot 10^{-3}$ M/l, c'est-à-dire entre 96 mcg/ml et 395 mcg/ml (tableau X). Parmi les vingt neuf souches testées, dix sept ont des CMI de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l, soit 192 mcg/ml. *STREPTOCOCCUS faecalis* est le germe le plus résistant, deux souches (*S.faecalis* ATCC 10541 et *S.faecalis* IPL 4740) ayant des CMI de $5 \cdot 10^{-3}$ M/l. Les deux souches les plus sensibles sont deux *PSEUDOMONAS aeruginosa* (souche collection du laboratoire et IPA 22).

9D - CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

souches		CMi en g/l $\times 10^{-3}$	CMi en mcg/ml
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 10541	1,25	226
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL 9	1,25	226
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL 4740	1,25	226
<i>Staphylococcus aureus</i> (*)		1,25	226
<i>Staphylococcus aureus</i>	IPL 9602	0,63	113
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	1,25	226
<i>Escherichia coli</i> (*)		0,63	113
<i>Escherichia coli</i>	IPL 2570	1,25	226
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	1,25	226
<i>Proteus vulgaris</i>	IPL 411	1,25	226
<i>Salmonella typhi</i>	IPL 7722	1,25	226
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IPL 21	1,25	226
<i>Serratia marcescens</i>	IPL 9591	1,25	226
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S 1	2,5	452
<i>Serratia liquefaciens</i>	S 3	1,25	226
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S 6	2,5	452
<i>Serratia rubideae</i>)	S 44	0,63	113
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>kiliensis</i>	S 52	1,25	226
<i>Serratia liquefaciens</i>	S 60	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (*)		0,63	113
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPA 22	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9543	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9541	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9539	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9542	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9547	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9548	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9550	1,25	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9556	1,25	226

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie
Pharmaceutique - Professeur Maurice CARRAZ -

16D - CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

souches		CMI en M/l $\times 10^{-3}$	CMI en mcg/ml
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 10541	1,25	162
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL 9	1,25	162
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL 4740	1,25	162
<i>Staphylococcus aureus</i> (*)		1,25	162
<i>Staphylococcus aureus</i>	IPL 9602	1,25	162
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	1,25	162
<i>Escherichia coli</i> (*)		1,25	162
<i>Escherichia coli</i>	IPL 2570	1,25	162
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	1,25	162
<i>Proteus vulgaris</i>	IPL 411	1,25	162
<i>Salmonella typhi</i>	IPL 7722	1,25	162
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IPL 21	1,25	162
<i>Serratia marcescens</i>	IPL 9591	2,5	325
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S 1	2,5	325
<i>Serratia liquefaciens</i>	S 3	2,5	325
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S 6	2,5	325
<i>Serratia rubideae</i>	S 44	1,25	162
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>kiliensis</i>	S 52	2,5	325
<i>Serratia liquefaciens</i>	S 60	2,5	325
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (*)		1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPA 22	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9543	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9541	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9539	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9542	2,5	325
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9547	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9548	1,25	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9550	2,5	325
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL 9556	2,5	325

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie
Pharmaceutique - Professeur Maurice CARRAZ -

21D - CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

Nom de l'organisme			Conc. en g/l $\times 10^{-2}$	Conc. en mg/ml
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC	10541	5	395
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL	9	2,5	192
<i>Streptococcus faecalis</i>	IPL	4740	5	395
<i>Staphylococcus aureus</i> (*)			2,5	192
<i>Staphylococcus aureus</i>	IPL	9602	2,5	192
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	6538	2,5	192
<i>Escherichia coli</i> (*)			2,5	192
<i>Escherichia coli</i>	IPL	2570	2,5	192
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	10536	2,5	192
<i>Proteus vulgaris</i>	IPL	411	1,25	96
<i>Salmonella typhi</i>	IPL	7722	2,5	192
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IPL	21	1,25	96
<i>Serratia marcescens</i>	IPL	9591	2,5	192
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S	1	2,5	192
<i>Serratia liquefaciens</i>	S	3	2,5	192
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>marcescens</i>	S	6	2,5	192
<i>Serratia rubideae</i>	S	44	1,25	96
<i>Serratia marcescens</i> var. <i>kiliensis</i>	S	52	1,25	96
<i>Serratia liquefaciens</i>	S	60	1,25	96
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (*)			0,63	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPA	22	0,63	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9543	2,5	192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9541	2,5	192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9539	2,5	192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9542	2,5	192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9547	1,25	96
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9548	1,25	96
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9550	2,5	192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL	9556	2,5	192

(*) Collection du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie
Pharmaceutique - Professeur Maurice CARRAZ -

2.2. ACTION SUR LES BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE -

Le tracé obtenu au biophotomètre enregistreur après addition du produit pendant la phase exponentielle de croissance d'ESCHERICHIA coli (collection du Laboratoire) est représenté par la figure 12 pour l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) et par la figure 14 pour l'acide acétohydroxamique (21D).

- Produit 9D acide orthophtalique monohydroxamique -

L'addition du produit à 10^{-3} M/l (concentration finale dans la cuve) provoque presque immédiatement une diminution progressive du taux de croissance, qui devient finalement nul (figure 12). Deux heures au plus après cette addition, on observe une stabilisation du pourcentage de transmission qui se maintient à une valeur de 70 pendant les 20 heures qui suivent. A cette concentration de 10^{-3} M/l, le produit possède un effet juste bactériostatique.

Après addition du produit 9D à $2 \cdot 10^{-3}$ M/l (concentration finale dans la cuve), on observe tout d'abord une diminution rapide du taux de croissance, puis un éclaircissement progressif du milieu apparaît pendant les 20 heures qui suivent et cela est traduit par une augmentation du pourcentage de transmission. A cette concentration, le produit a un effet bactériolytique et la figure 13 schématise les différentes phases de la bactériolyse que nous discuterons plus loin.

- Produit 21D acide acétohydroxamique -

Pour une concentration finale de $0,63 \cdot 10^{-3}$ M/l, le produit provoque immédiatement après son addition une diminution du taux de croissance qui reste cependant positif.

La phase de stabilisation est obtenue 4 heures après celle de la cuve témoin et le nombre de microorganismes reste toujours un peu inférieur à celui observé dans le témoin (figure 14).

A $1,25 \cdot 10^{-3}$ M/l, l'annulation du taux de croissance est obtenue très rapidement : 45 minutes après addition. On observe ensuite une phase de bactériolyse extrêmement rapide puisque 4 heures après addition du produit, le T% a repris sa valeur initiale et l'éclaircissement du milieu est total.

Lorsque l'acide acétohydroxamique est ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 10^{-2} M/l, la diminution du taux de croissance est très rapide et ce dernier s'annule 30 à 45 minutes après. Pendant les 20 heures qui suivent, on observe une augmentation très progressive du T%.

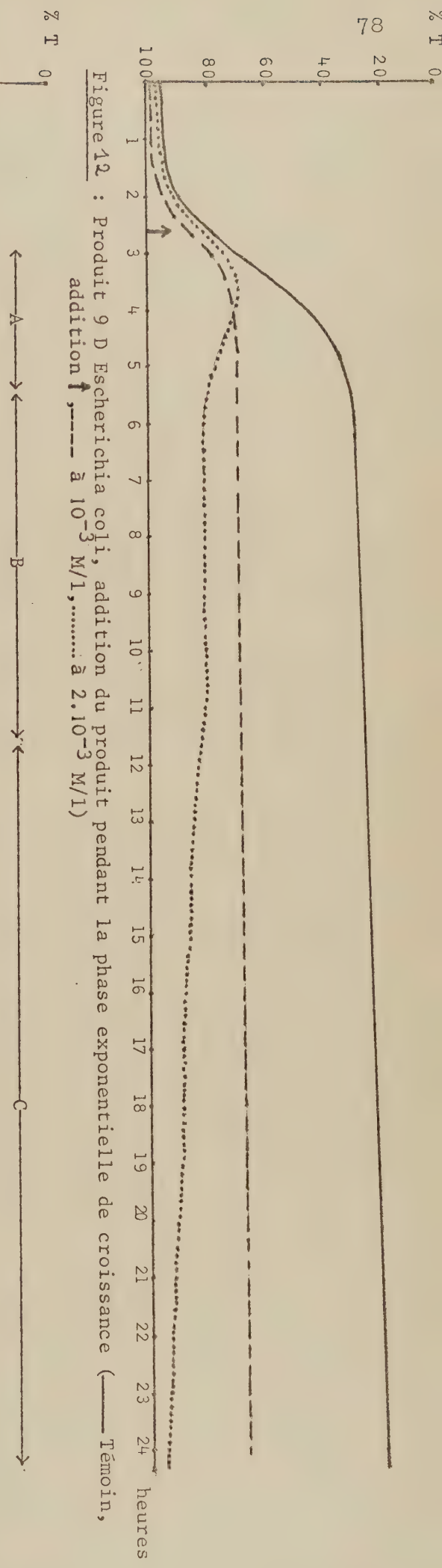
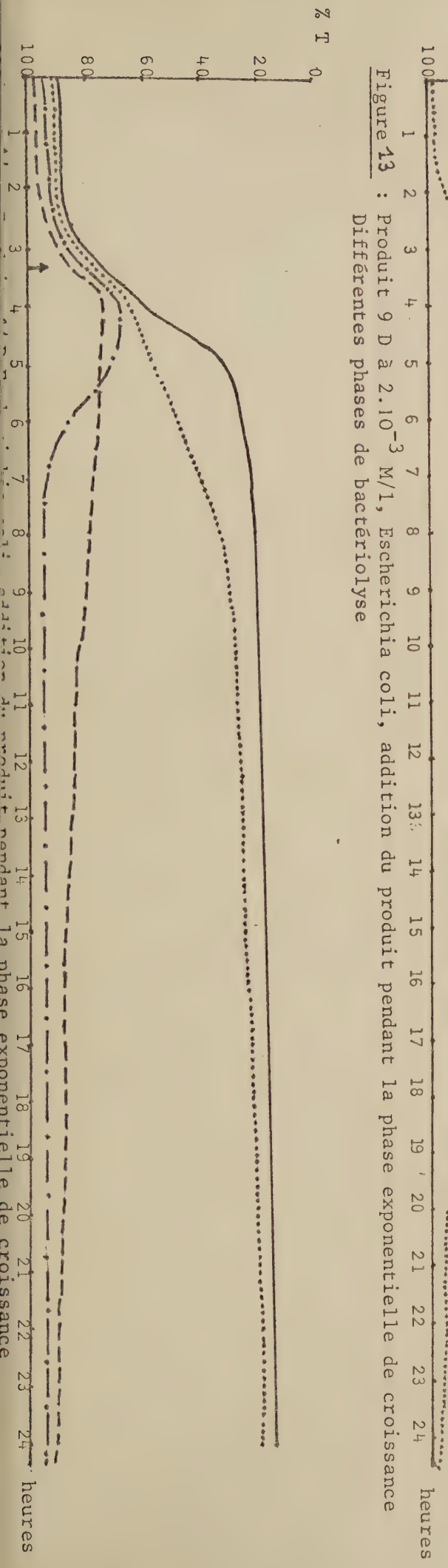


Figure 13 : Produit 9 D à 2.10^{-3} M/l, *Escherichia coli*, addition du produit pendant la phase exponentielle de croissance

Différentes phases de bactériolyse



2.3. CONCENTRATIONS MINIMALES BACTERICIDES - CMB -

Les résultats des CMB pour les acides hydroxamiques 9D, I6D et 21D sont rassemblés dans le tableau XI. Nous avons déterminé la CMB d'un produit en recherchant sa plus faible concentration capable de provoquer un pourcentage de destruction des microorganismes supérieur ou égal à 99,999. Il faut cependant noter que nos résultats sont identiques si l'on retient comme valeur limite du pourcentage de destruction 99,99.

Aux plus fortes concentrations testées ($2,5 \cdot 10^{-2}$ M/l pour 9D et $5 \cdot 10^{-2}$ M/l pour I6D et 21D), aucun des produits n'est bactéricide sur les quatre souches de microorganismes (ESCHERICHIA coli ATCC IO536, PSEUDOMONAS aeruginosa IP A22, STREPTOCOCCUS faecalis ATCC IO541 et STAPHYLOCOCCUS aureus ATCC 6538), que le temps de contact bactéries-substances soit de 15 ou de 30 minutes.

Les trois acides hydroxamiques sont plus actifs sur les bactéries Gram - que sur les bactéries Gram + et, à une concentration de $1,25 \cdot 10^{-2}$ M/l, ils sont tous trois bactéricides pour PSEUDOMONAS aeruginosa IP A22 après 30 minutes de contact.

L'acide orthophtalique monohydroxamique 9D est bactéricide pour le bacille pyocyanique à 2,26 g/l, pour un temps de contact de 15 minutes, mais ne provoque pas une destruction de 99,999 % des trois autres souches à la plus forte concentration testée (4,52 g/l).

L'acide malléique monohydroxamique est bactéricide à 1,62 g/l après un contact de 15 minutes avec *ESCHERICHIA coli* et un contact de 30 minutes avec *PSEUDOMONAS aeruginosa*. Pour *STAPHYLOCOCCUS aureus* et *STREPTOCOCCUS faecalis*, les CMB sont supérieures à 6,50 g/l.

• L'acide acétohydroxamique 21D, bactéricide à 0,96 g/l en 15 minutes avec *PSEUDOMONAS aeruginosa*; l'est également avec *ESCHERICHIA coli* et *STREPTOCOCCUS faecalis*, mais à 3,95 g/l et après un contact de 30 minutes. Il n'est pas bactéricide à cette concentration pour *STAPHYLOCOCCUS aureus*.

- Tableau XI -
CMB des ACIDES HYDROXAMIQUES 9D, 16D et 21D

souches	temps de contact	9 D	16 D	21 D	
		$\times 10^{-2}$ M/l	g/l	$\times 10^{-2}$ M/l	g/l
Escherichia coli ATCC 10536	15 ' 30 '	$> 2,5$ $> 2,5$	$> 4,52$ $> 4,52$	1,25 1,25	1,62 1,62
Pseudomonas aeruginosa IP A22	15 ' 30 '	1,25 1,25	2,26 2,26	2,5 1,25	3,25 1,62
Streptococcus faecalis ATCC 10541	15 ' 30 '	$> 2,5$ $> 2,5$	$> 4,52$ $> 4,52$	> 5 > 5	$> 6,50$ $> 6,50$
Staphylococcus aureus ATCC 6538	15 ' 30 '	$> 2,5$ $> 2,5$	$> 4,52$ $> 4,52$	> 5 > 5	$> 6,50$ $> 6,50$

Quatrième Partie

DISCUSSION

Quatrième Partie :

DISCUSSION.

1. CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES - CMI -

- 1.1. Activité fungistatique.
- 1.2. Activité bactériostatique.
- 1.3. Intérêt de l'étude au biophotomètre.

2. ACTION SUR LES BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE ET CONCENTRATIONS MINIMALES BACTERICIDES - CMB -

3. ESSAI DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.

- 3.1. Structure et spectre d'action.
- 3.2. Influence des atomes de chlore.
- 3.3. Les dérivés cyclisés.
- 3.4. Relation structure-activité pour les acides hydroxamiques de la série aromatique.

4. PERSPECTIVES.

1. - CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES - CMI -

1.1. ACTIVITE FUNGISTATIQUE -

Malgré le faible pouvoir fungistatique de l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) et de l'acide benzo - hydroxamique -11D-, cette série de produits ne présente pas une activité très intéressante sur les fungi. En effet, les moisissures du genre ASPERGILLUS, qui font partie, avec les PSEUDOMONAS, des microorganismes les plus résistants à l'action des agents antimicrobiens (GUINET et CARRAZ, 1976), ne sont sensibles à aucun des produits aux concentrations testées.

Notons cependant que, en raison de la faible solubilité de la plupart des produits, nous n'avons pas pu les tester à des concentrations supérieures à 10^{-3} M/l, soit environ 0,1 à 0,2 g/l. Or, la plupart des antiseptiques utilisés comme conservateurs, qui sont chimiquement assez proches des acides hydroxamiques, sont utilisés à des concentrations dix fois supérieures. Les concentrations usuelles sont de 1 à 1,5 g/l pour l'acide sorbique et ses sels, de 1 à 2 g/l pour l'acide benzoïque et son sel de sodium et de 2 à 5 g/l pour les phénols et les crésols (DESBORDES et JOURDAN 1974, JAMINET 1970, DESVIGNES et coll. 1974, GUINET et CARRAZ 1976).

Nous devons pourtant constater que des chlorothymols récemment décrits (VINCENT FALQUET et CARRAZ 1974) présentent une bien meilleure activité testée sur les mêmes souches de champignons et par la même méthode, puisque les concentrations minimales fungistatiques vont de 6,25 mg/l à 50 mg/l (GUINET et CARRAZ 1976).

1.2. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE -

Nous avons vu en 2.1. de la troisième partie que les trois produits les plus intéressants (9D, 16D et 21D) présentaient une activité bactériostatique sur un assez large éventail de bactéries.

Les trois produits ont des concentrations minimales inhibitrices exprimées en M/l sensiblement identiques puisque, sur l'ensemble des souches testées, la CMI moyenne est de 1,25 M/l (tableaux VIII, IX et X).

Ces acides hydroxamiques ont donc un spectre d'action relativement large et ce qui nous semble le plus intéressant c'est leur activité sur les bacilles Gram - et, plus spécialement, les espèces responsables de l'hospitalisme. La sensibilité à ces produits de plusieurs souches de *SERRATIA* biochimiquement différentes est à peu près la même; *SERRATIA rubidaea* est cependant la plus sensible notamment à l'acide orthophtalique monohydroxamique et à l'acide malléique hydroxamique.

Le fait le plus remarquable est certainement que le bacille pyocyannique, un des microorganismes les plus résistants à l'action des agents antimicrobiens, soit aussi sensible à ces trois acides hydroxamiques que les autres germes. Des trois produits, c'est l'acide orthophtalique monohydroxamique qui possède l'action la plus régulière puisque, pour neuf souches parmi dix testées, les CMI sont de $1,25 \cdot 10^{-3}$ M/l.

Nous avons testé des souches de *PSEUDOMONAS aeruginosa* appartenant à différents sérotypes et nous n'avons pas trouvé de différence de sensibilité significative. (Tableau XII).

- Tableau XII -
CMI DE 9D, 16D et 21D POUR DES SOUCHES DE PSEUDOMONAS aeruginosa DE
SÉROTYPES DIFFÉRENTS

souches	sérotipe	9 D		16 D		21 D	
		$\times 10^{-3}$ W/l	mcg/ml	$\times 10^{-3}$ W/l	mcg/ml	$\times 10^{-3}$ W/l	mcg/ml
Pseudomonas aeruginosa IPL 9539	0 2	1,25	226	1,25	162	2,5	192
Pseudomonas aeruginosa IPL 9541	0 3	1,25	226	1,25	162	2,5	192
Pseudomonas aeruginosa IPL 9542	0 12	1,25	226	2,5	325	2,5	192
Pseudomonas aeruginosa IPL 9543	0 10	1,25	226	1,25	162	2,5	192
Pseudomonas aeruginosa IPL 9556	0 1	1,25	226	2,5	325	2,5	192

1.3. INTERET DE L'ETUDE AU BIOPHOTOMETRE -

L'étude des variations de la densité optique d'une suspension de microorganismes (HAMMOND 1975), de même que l'enregistrement en continu des courbes de croissance - après addition d'un agent antimicrobien - (DUCHENE 1961), sont des méthodes peu utilisées comme test de sélection de molécules à activité antibactérienne. La détermination des concentrations minimales inhibitrices par la technique des dilutions en gélose est, par contre, souvent employée, car elle est considérée comme une méthode sûre et fiable (LELUAN 1971, JOURDAN 1972, DESBORDES 1973).

Pour l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D), l'acide malléique hydroxamique (I6D) et l'acide acéto hydroxamique (21D), nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices pour trois souches bactériennes par les deux méthodes et nous pouvons comparer les résultats obtenus (Tableau XIII). Compte tenu du fait que la concentration de la solution mère de la gamme de dilution utilisée pour chacun des deux tests n'a pas toujours été la même, nous constatons que les résultats sont très voisins, bien que la technique de dilution en milieu gélosé semble -peut être- un peu plus sévère.

Les CMI obtenues à l'aide du biophotomètre enregistreur sont donc tout à fait comparables à celles obtenues en milieu gélosé, et cette première technique présente en outre un avantage important sur la seconde, celui de déceler des inhibitions partielles, dont la durée est inférieure à 18 ou 24 heures. Le premier produit que nous avons testé (1D) n'a aucune action à 8.10^{-4} M/l sur PSEUDOMONAS aeruginosa ni sur STAPHYLOCOCCUS aureus et retarde l'apparition de la phase exponentielle de croissance d'ESCHERICHIA coli de 3 à 4 heures par rapport au témoin.

C'est la découverte de cette inhibition, certes faible mais non décelable en utilisant la méthode de dilution en gélose, qui nous a incité à aller plus avant dans la recherche des activités antibactériennes, des acides hydroxamiques.

Par ailleurs, nous pouvons constater la très bonne fidélité de la technique en comparant les courbes témoins des différentes figures précédentes. Dans les mêmes conditions expérimentales (agitation, température, milieu et inoculum), nous obtenons toujours pour *ESCHERICHIA coli* une phase exponentielle de croissance de trois à quatre heures, précédée d'une phase apparente de latence de deux heures et demie à trois heures.

- Tableau XIII -
COMPARAISON DES CMI EN M/1 OBTENUES POUR TROIS PRODUITS PAR DEUX
METHODES DIFFERENTES

Produits	Méthode	Microorganismes		
		E. coli	S. aureus	Ps. aeruginosa
9D	action sur la courbe de croissance	10^{-3}	5.10^{-4}	10^{-3}
	dilution en milieu solide	$6,3.10^{-4}$	$1,25.10^{-3}$	$6,3.10^{-4}$
16D	action sur la courbe de croissance	$1,25.10^{-3}$	$1,25.10^{-3}$	10^{-3}
	dilution en milieu solide	$1,25.10^{-3}$	$1,25.10^{-3}$	$1,25.10^{-3}$
21D	action sur la courbe de croissance	10^{-3}	5.10^{-4}	10^{-3}
	dilution en milieu solide	$2,5.10^{-3}$	$2,5.10^{-3}$	$1,25.10^{-3}$

2. - ACTION SUR LES BACTERIES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE ET CMB

L'acide orthophtalique monohydroxamique (9D), ajouté pendant la phase exponentielle de croissance d'*ESCHERICHIA coli*, est bactériostatique à 10^{-3} M/l, car nous observons une stabilisation du pourcentage de transmission et est bactériolytique à 2.10^{-3} M/l puisqu'il apparaît un éclaircissement du milieu que traduit l'augmentation du pourcentage de transmission (figure 12). Si l'on analyse la courbe de bactériolyse (figure 13), on peut distinguer trois phases successives :

- une phase A de lyse rapide, durant deux heures environ après addition du produit;
- une phase B de stabilisation;
- une phase C de lyse progressive, commençant sept à huit heures après addition.

Ces phases différentes de l'action d'un agent antimicrobien sur *ESCHERICHIA coli* ont été signalées auparavant par BEAN et DAS (1966). La phase A d'éclaircissement rapide du milieu serait due à une libération de constituants cytoplasmiques, alors que la phase C de lyse tardive serait due à l'action des systèmes enzymatiques autolytiques de la bactérie. (BEAN 1967).

L'acide acétohydroxamique (21D) provoque aux trois concentrations testées trois effets différents sur les bactéries en phase exponentielle de croissance (figure 14).

Pour la plus faible concentration ($0,62.10^{-3}$ M/l), nous observons simplement une diminution du taux de croissance d'*ESCHERICHIA coli*.

Dans ce cas, nous assistons très certainement à une inhibition de la synthèse de métabolites essentiels, nécessaires à une multiplication rapide des bactéries. Cet effet est également vraisemblablement responsable de la bactériostase, comme cela fut noté par DAGLEY et coll. (1950) au sujet de l'action des composés phénoliques.

A $1,25 \cdot 10^{-3}$ M/l, l'éclaircissement rapide et total du milieu traduit une bactériolyse et correspond à une libération des constituants du cytoplasme.

A la plus forte concentration (10^{-2} M/l), une action brutale du produit sur les bactéries apparaît. Après stabilisation immédiate du pourcentage de transmission suivant l'addition de l'acide acétohydroxamique, l'éclaircissement du milieu est progressif. Ce dérivé semble donc, à cette concentration, avoir une action drastique sur la cellule bactérienne, avec probablement coagulation rapide et brutale des différents constituants (HUGO et LONGWORTH 1964). L'étude en microscopie électronique et à balayage, utilisée récemment pour l'étude du mode d'action des désinfectants (GILLELAND 1974, RICHARDS et CAVILL 1976) pourrait probablement nous renseigner sur le niveau d'action de ces acides hydroxamiques.

L'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) et l'acide acétohydroxamique (21D) sont bactériolytiques pour *ESCHERICHIA coli* à des concentrations voisines des concentrations bactériostatiques et ces résultats nous laissaient présager un pouvoir bactéricide intéressant. Or, nous avons vu (Tableau XI) que les concentrations minimales bactéricides pour *ESCHERICHIA coli* sont supérieures aux concentrations testées et cela nous amène aux réflexions suivantes.

La méthode de filtration sur membrane, utilisée pour la détermination des concentrations minimales bactéricides, est certainement assez sévère et cela pourrait expliquer ces différences. Par contre, nous ne pensons pas que le temps de contact bactéries - substance ait une grande influence sur les résultats. En effet, à la suite de travaux parallèles concernant l'activité bactéricide du chlorure de Benzalkonium (CLUZEL 1973, GREBUS 1973, FLEURETTE 1973), l'analyse des résultats a montré que ni le temps de contact, ni la technique utilisée, ni la nature des souches (souches sauvages ou souches de collections) n'avaient une importance capitale sur les valeurs des CMB obtenues pour un produit à haut pouvoir bactéricide (CREMIEUX 1973).

Bien plus que tout ce qui précède, l'état des bactéries soumises à l'action d'un agent antimicrobien nous semble avoir une grande importance. La plupart des techniques utilisent des microorganismes après culture de dix huit à vingt quatre heures et, donc, en phase stationnaire de croissance - comme cela fut le cas dans la méthode de filtration sur membrane que nous avons utilisée - alors qu'au biophotomètre enregistreur, une bactériolyse apparaît après addition du produit à des germes en phase exponentielle de croissance. Nous nous proposons de vérifier expérimentalement cette hypothèse qui est intéressante car elle permet d'envisager une action relativement spécifique des acides hydroxamiques, alors que ce n'est pas le cas de la grande majorité des antiseptiques ou des désinfectants. Malgré les nombreuses recherches consacrées au mode d'action d'agents antimicrobiens comme le glutaraldéhyde (MUNTON et RUSSEL 1972 et 1973), la chlorhexidine (HUGO 1964 et 1975, DALTREY 1975), la dibromo propanidine (WOODSIDE 1973) ou les phénols, alcools et dérivés (DAGLEY 1950, HUGO 1971 et 1973, PROUDFOOT 1975), il semble bien que la plupart des produits soient dépourvus d'un mécanisme d'action spécifique et exercent plutôt une activité brutale et drastique sur les couches les plus externes de la cellule bactérienne (HUGO 1967, HAMILTON 1970).

3. - ESSAI DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

3.1. STRUCTURE ET SPECTRE D'ACTION -

Lorsque l'on compare les activités des dérivés 1D, 2D et 9D (Tableau XIV) on constate que :

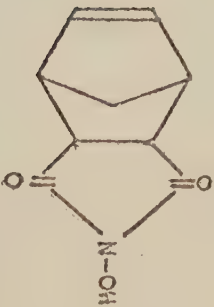
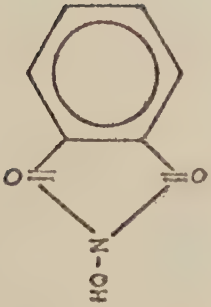
- le dérivé de la série alicyclique 1D n'est actif que sur *ESCHERICHIA coli*, alors que les dérivés appartenant à la série aromatique sont également actifs sur *STAPHYLOCOCCUS aureus*.
- les produits à cyclisation interne entre la fonction acide carboxylique et la fonction acide hydroxamique 1D, 2D, sont inactifs sur *PSEUDOMONAS aeruginosa*.
- l'acide orthophtalique monohydroxamique, dont les fonctions acide carboxylique et acide hydroxamique sont libres et fixées sur un noyau aromatique, possède une activité sur les trois germes testés.

Nous constatons de plus que l'acide malléique monohydroxamique (16D) et l'acide acétohydroxamique (21D) sont actifs sur *ESCHERICHIA coli*, *PSEUDOMONAS aeruginosa* et *STAPHYLOCOCCUS aureus*, alors que la N hydroxysuccinimide (17D) est inactive aux mêmes concentrations sur ces trois bactéries. (Tableau XV).

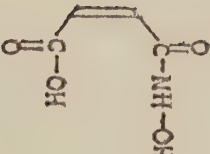
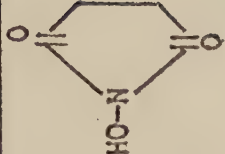
3.2. INFLUENCE DES ATOMES DE CHLORE -

L'halogénéation de molécules chimiques douées de propriétés antimicrobiennes a souvent pour effet d'augmenter l'activité. Cet effet, connu depuis longtemps pour les dérivés phénoliques (COULTHARD 1930, SUTTER 1941), a été rappelé et précisé plus récemment (HUGO 1967, DULONG DE ROSNAY 1974, SCHROTTER 1974). De plus, le même phénomène a été retrouvé pour des céphalosporines de semi-synthèse à activité anti-tuberculeuse (MISIEK 1973), et pour des dérivés du diphenyl-méthane à activité antifongique (CAPEK 1975).

- Tableau XIV -
COMPARAISON DES ACTIVITES AU BIOPHOTOMETRE ENREGISTREUR DES
ACIDES HYDROXAMIQUES 1D, 2D et 9D

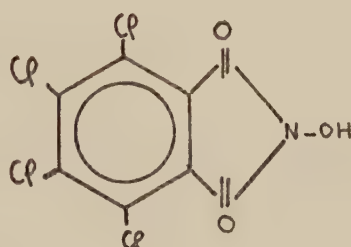
Microorganismes			Méthode	Produits
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa		
3 à 4 h à 8.10^{-4}	inactif à 8.10^{-4}	inactif à 8.10^{-4}	action sur la courbe de croissance concentration bactériostatique en M/l	
$>8.10^{-4}$	$>8.10^{-4}$	$>8.10^{-4}$		2 D 
2 h à 10^{-4}	4 h à 2.10^{-4}	inactif à 8.10^{-4}		9 D 
5 h à 5.10^{-4}	5 h à $2,5.10^{-4}$	3 h à $2,5.10^{-4}$	action sur la courbe de croissance	concentration bactériostatique en M/l
10^{-3}	5.10^{-4}	10^{-3}		

- Tableau XV -
COMPARAISON DES ACTIVITES AU BIOPHOTOMETRE ENREGISTREUR DES
ACIDES HYDROXAMIQUES 1D, 2D et 9D

Microorganismes		
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa
Produits	Méthode	
16 D 	action sur la courbe de croissance	
	12 h à 10 ⁻³	10 h à 10 ⁻³
		3 h à 2,5.10 ⁻⁴
	concentration bactériostatique en M/l	
	1,25.10 ⁻³	1,25.10 ⁻³
		10 ⁻³
17 D 	action sur la courbe de croissance	
	4 h à 10 ⁻²	inactif à 10 ⁻²
	concentration bactériostatique en M/l	
	>10 ⁻²	>10 ⁻²
		inactif à 10 ⁻²
		>10 ⁻²

Si l'halogénéation augmente l'activité antimicrobienne, par contre, elle diminue la solubilité dans l'eau et augmente la toxicité. Cependant, il semble bien que la présence d'un ou deux atomes de chlore sur un noyau aromatique suffise pour augmenter l'activité antimicrobienne, sans pour cela aboutir à des produits plus toxiques (SHROTTER 1974, CAPEK 1975, VINCENT FALQUET 1974, GUINET 1976).

La présence de deux atomes de chlore a multiplié l'activité du produit 1D sur *ESCHERICHIA coli* par un facteur huit et cela est représenté par le produit 4D; Un dérivé tétrachloré de la N-hydroxyphthalimide (2D) active sur *ESCHERICHIA coli* et *STAPHYLOCOCCUS aureus* a été préparé (6D).



Malheureusement, ce produit est insoluble dans l'eau à 10^{-3} M/l et les solutions à 10^{-2} M/l en diméthyl sulfoxyde reprécipitent dans le bouillon ordinaire. C'est pourquoi, ce dérivé tétrachloré de la N-hydroxyphthalimide ne figure pas parmi les produits testés.

3.3. LES DERIVES CYCLISES -

Afin d'augmenter la solubilité dans l'eau du N-hydroxyphthalimide (2D), actif sur *ESCHERICHIA coli* et *STAPHYLOCOCCUS aureus*, le sel sodique du N-hydroxyl a été préparé (5D). Ce produit, très soluble dans l'eau, ne présente pas d'activité antimicrobienne, même à des concentrations de 10^{-2} M/l. Le N, N-diméthylamino-phthalimide (19D) et le N-méthyl-3 dioxo-1, 4 benzoxazine-2,3 (20D) sont inactifs et cela nous permet de souligner le rôle de l'hydroxyle fixé sur l'azote. Dans d'autres séries chimiques, différents auteurs ont également remarqué l'importance des groupements hydroxyls (SCHROTTER 1974, SAKI 1974, CAPEK 1975, BENVENISTE 1973).

Les dérivés qui possèdent des substituants en meta par rapport aux fonctions acide hydroxamique et acide benzoïque (7D, 8D et 26D) ne présentent pas non plus d'activité. Nous pensons que, dans ces cas, c'est l'augmentation de l'encombrement stérique qui amène une perte d'activité par rapport au dérivé sans substituant (DIMMOCK 1974 et 1976, PESSON 1975 a et b, POWERS 1975, AKERBLOM 1974), bien que le dérivé 26D, dont l'encombrement est vraisemblablement comparable à celui du dérivé 7D, conserve un faible pouvoir bactérien.

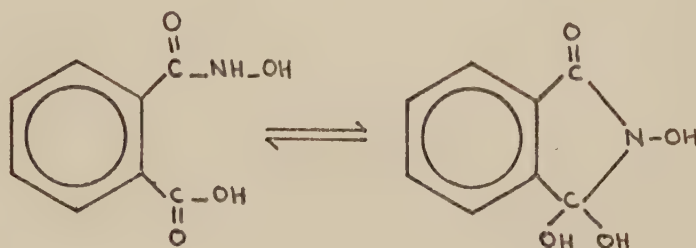
Enfin, la présence d'une fonction acide sulfonique à la place d'une fonction acide carboxylique dans le dérivé cyclisé (24D) fait disparaître l'activité et il semble donc que la présence et la proximité de deux carboxyles soient nécessaires (2D).

3.4. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE POUR LES ACIDES HYDROXAMIQUES DE LA SERIE AROMATIQUE -

Les sels monosodiques (12D) et organiques (14D) sur la fonction acide carboxylique de l'acide orthophtalique monohydroxamique sont inactifs. Le remplacement sur le cycle benzénique de la fonction acide carboxylique par une fonction acide sulfonique (23D), par un groupement hydroxyl (22D), par l'iode (15D) ou sa suppression pure et simple (11D), n'a pas conduit à des dérivés aussi actifs que l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D). D'autre part, lorsque le cycle benzénique est remplacé par la pyridine (13D) ou par la pyrazine (10D), nous obtenons des dérivés à activité nulle à 10^{-3} M/l. Ces résultats impliquent que la présence des fonctions acide hydroxamique et acide carboxylique sous forme libre et sur un noyau aromatique sont nécessaires à l'obtention du pouvoir bactériostatique sur les trois germes testés. De plus, ces deux fonctions doivent être proches l'une de l'autre, puisque l'acide téréphtalique monohydroxamique (18D), isomère de position de l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D), est inactif.

Nous avons déjà constaté (3.3.) que, pour les dérivés à cyclisation interne, la présence et la proximité des deux carboxyles étaient nécessaires.

L'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) est le seul produit à noyau aromatique qui possède, dans cette série d'acides hydroxamiques, une activité bactériostatique sur les trois germes testés : *ESCHERICHIA coli*, *STAPHYLOCOCCUS aureus* et *PSEUDOMONAS aeruginosa*. Cependant, l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) est vraisemblablement présent en solution aqueuse sous deux formes qui sont en équilibre.



Parmi les nombreux facteurs qui influencent l'activité des agents antimicrobiens (ALBERT 1947 et 1953, RICHARDS 1973, RUSSELL 1974), le pH a un rôle prépondérant (LELUAN 1971, SABATH 1974), notamment en permettant un déplacement des équilibres de différentes formes d'une substance en solution aqueuse (KING 1974). Afin d'éviter une forte dissociation des fonctions acides (qui aboutit, nous l'avons vu, à une cyclisation interne et à une perte d'activité antipyocyanique), des dérivés de l'acide orthophtalique monohydroxamique possédant des substituants en meta ont été préparés. Les dérivés 29D, 30D, 34D et 35D ne sont cependant actifs sur aucun des trois germes testés à 10^{-3} M/l et cela est vraisemblablement dû à l'importante augmentation de l'encombrement stérique.

Si l'on ajoute une seconde fonction acide carboxylique à l'acide orthophtalique monohydroxamique en ortho (27D) ou en para (28D) de la première, l'activité antibactérienne sur les trois germes tests est conservée, mais est inférieure à celle du produit de départ (9D). Des résultats voisins ou moins bons sont obtenus pour les dérivés du 9D, qui possèdent une fonction amine en para (33D) ou deux fonctions acides carboxyliques et acides hydroxamiques en para libres (32D), ou cyclisées d'un côté de la molécule (31D).

En conclusion de cet essai de relation structure-activité antibactérienne pour les acides hydroxamiques étudiés, on peut dire que l'activité sur les trois germes testés, et plus particulièrement sur *PSEUDOMONAS aeruginosa*, est fournie par des molécules dont l'encombrement stérique est minimum et que la fonction acide hydroxamique possède une activité lorsqu'elle est sur un noyau aromatique en position ortho d'une fonction acide carboxylique.

Le mécanisme de l'action de l'acide orthophtalique monohydroxamique, en particulier sur *PSEUDOMONAS aeruginosa*, pourrait être dû au pouvoir chélateur de cette molécule, comme cela a été noté dans d'autres cas (SMITH 1970, HAQUE 1974 et 1975, GILLELAND 1974, DANKERT 1976).

4. - PERSPECTIVES

Trois acides hydroxamiques :

- 9D acide orthophtalique monohydroxamique
- 16D acide malléique monohydroxamique
- 21D acide acetohydroxamique

ont montré des propriétés bactériostatiques intéressantes qui permettent éventuellement d'envisager des applications. Avant cela, il sera nécessaire d'évaluer leur toxicité aiguë et chronique chez l'animal (des essais préliminaires semblent montrer que l'acide orthophtalique monohydroxamique (9D) est peu toxique pour le rat) et éventuellement de conduire des études de pharmacocinétique pour ces produits. Nous nous proposons, dans l'immédiat, de tester l'activité antibactérienne in vivo et d'éclaircir, le mode d'action de ces substances à l'aide de la microscopie à balayage. Puis, suivant les résultats, des tests complémentaires in vitro, in vivo ou mixtes devront être pratiqués en fonction des applications envisagées dans le domaine des conservateurs, des désinfectants ou des antiseptiques (SPICHER 1970, KAUFMANN 1973, REBER 1972, SCHMIDT 1974, GUINET 1976) ou dans d'autres domaines de la chimiothérapie microbienne.

A la suite de ce travail concernant l'étude de l'activité antimicrobienne des acides hydroxamiques, il apparaît que de nombreuses possibilités de recherches complémentaires nous sont ouvertes, et nous espérons poursuivre des travaux en ce sens, notamment en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Organique de Monsieur le Professeur DAUDON.

R E S U M E

Par deux méthodes simples de criblage, nous avons recherché l'activité bactériostatique et fungistatique d'une trentaine de molécules chimiques de synthèse appartenant à la série des acides hydroxamiques. Les résultats de l'activité bactériostatique nous ont permis tout d'abord de retenir trois produits intéressants, ensuite de discuter l'intérêt de rechercher l'activité antimicrobienne à l'aide du biophotomètre enregistreur et, enfin, d'essayer de dégager dans cette série chimique des notions de relation structure-activité antibactérienne.

Pour l'acide orthophtalique monohydroxamique, l'acide malléique monohydroxamique et l'acide acétohydroxamique, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices pour vingt neuf souches bactériennes, recherché l'action sur des bactéries en phase exponentielle de croissance et le pouvoir bactéricide par la méthode de filtration sur membrane. Ces acides hydroxamiques présentent un pouvoir bactériostatique intéressant, notamment à l'encontre de *PSEUDOMONAS aeruginosa* et (alors qu'ils sont bactériolytiques pour *ESCHERICHIA coli* en phase exponentielle de croissance) ils ne présentent qu'un faible pouvoir bactéricide aux concentrations testées.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYDROXAMIC ACIDS

SUMMARY.-

Thirty two hydroxamic acids have been investigated for their bacteriostatic and fungistatic activities with two simple methods of screening. Three interesting products have been first selected because of their bacteriostatic activities. The study of antimicrobial activity with a biophotometer is then discussed. Finally, we have tried to clear some structure-antimicrobial activity relationships in this serie.

We have determined the minimal inhibitory concentrations for twenty nine bacterial strains with orthophtalic monohydroxamic acid, malleic monohydroxamic acid, and acetohydroxamic acid, enquired their actions on bacteria in exponential growth phase and their bactericidal activity with a membrane filter technique. These hydroxamic acids show an interesting bacteriostatic activity, specially for *PSEUDOMONAS aeruginosa*, and (although they are bacteriolytic for *ESCHERICHIA coli* in exponential growth phase). They don't exhibit a pronounced bactericidal activity.

CONCLUSIONS

Aucun des 32 acides hydroxamiques étudiés ne présente d'activité antifongique pour des levures, moisissures et dermatophytes à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-3} M/l. Par contre, la recherche de l'activité antibactérienne au biophotomètre enregistreur nous a permis, d'une part de retenir un certain nombre de produits actifs contre *ESCHERICHIA coli*, *STAPHYLOCOCCUS aureus* et *PSEUDOMONAS aeruginosa* et, d'autre part, de souligner l'intérêt d'étudier l'activité antibactérienne de molécules nouvelles par l'enregistrement en continu des courbes de croissance des microorganismes. Les relations structure - activité impliquent que la fonction acide hydroxamique possède une activité antimicrobienne lorsqu'elle se trouve sur un cycle benzénique simple en ortho d'une fonction acide carboxylique.

Bien que l'acide orthophtalique monohydroxamique, l'acide malléique hydroxamique et l'acide acétohydroxamique ne présentent qu'un faible pouvoir bactéricide aux concentrations testées par la méthode de filtration sur membrane, ils sont bactériolytiques pour *ESCHERICHIA coli* en phase exponentielle de croissance. Pour ces trois produits, les concentrations minimales inhibitrices, déterminées pour vingt neuf souches bactériennes par la méthode de dilution en gélose, sont de l'ordre de 10^{-3} M/l. Il faut remarquer notamment la sensibilité des différentes souches de bacille pyocyanique à ces acides hydroxamiques qui peuvent, pour cette raison, présenter un intérêt, bien que notre recherche - dans cette série - de molécules ayant des CMI plus faibles ou un pouvoir bactéricide plus important n'ait pas abouti.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

Vu, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R. DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

L. ODDOUX

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 11 mai 1976

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,

D. GERMAIN

B I B L I O G R A P H I E

En raison de l'important volume des publications dans ce vaste domaine, les documents de ces quatre dernières années concernant l'activité antimicrobienne in vitro des substances chimiques ont plus particulièrement retenu notre attention.

-
- ABDOU M.A.F., EWALD O.P. - Synthetic medium for testing susceptibility. III Relationship of inhibitory zone diameter by Agar diffusion test and minimal inhibitory concentration by broth dilution test.
- Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A 233, (3), 355 (1975).
- A.F.N.O.R. - Antiseptiques et désinfectants. Vocabulaire.
- NF.T 72-IOI.
- A.F.N.O.R. - Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables. Détermination de l'activité bactéricide. Méthode par dilution-neutralisation.
- NF.T 72-I50 (1974a).
- A.F.N.O.R. - Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide et miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide. Méthode par filtration sur membrane.
- NF.T. 72-I5I -(1974b)-
- AKERBLOM E.B., - Synthesis and structure activity relationships of a serie of antibacterially active 5-(5-nitro 2-furfurylidene) thiazolones, 5-(5-nitro 2-furylpropenylidene) thiazolones, and 6-(5-nitro 2-furyl)-4H-1, 3-thiazinones.
- J. Med. Chem, 17, (6), 609-614, (1974).
- ALBERT A., GIBSON M.I., RUBBO J.D. - The influence of chemical constitution on antibacterial activity. VI The bactericidal action of 8 hydroxyquinoline (oxine).
- Brit. J. Exp. Path., 34, 119-130, (1953).
- ALBERT A., RUBBO J.D., GOLDBACKE R.J., BALFOUR B. - The influence of chemical constitution on antibacterial activity. III A Study of 8 hydroxyquinoline (oxine) and related compounds.
- Brit. J. Exp. Path., 28, 69-87, (1947).

- ALBRECHT R. - Investigations about the antibacterial activity of quinolone-carboxylic acids. III Methyl 1 ethyl 4 quinolones 3-carboxylates and some 3 substituted quinolones.
- Eur. J. Med. Chem., Chim. Ther., 8, (1), 45-48, (1973).
- ALBRECHT R., HOYER G.A. - Investigations about the antibacterial activity of quinolone carboxylic acids.
- Eur. J. Med. Chem., Chim. Ther., 8, (3), 346-349, (1973).
- ANNEN D.I., NORCOTT T.T., RUHEN R.B. - The Agar dilution method of testing the sensitivity of Bacteria to antibiotics.
- Pathology, 6, (1), 45-52, (1974).
- Arrêté du 16 Avril 1973 - Méthodes officielles d'analyse des cosmétiques et des produits de beauté.
- J.O. du 5 Juin 1973.
- Association of Official Agricultural Chemists. - Official methods of analysis of the association of Official Agricultural Chemists.
- IOe ed., Washington, 1965.
- BASTIANINI L. - Control antiseptics by a microbiological method.
- Il Farmaco, 30, (3), 140, (1975).
- BEAN H.S. - Types and characteristics of disinfectants.
- J. Appl. Bact., 30, (1), 6-16, (1967).
- BEAN H.S., DAS A. - The adsorption by ESCHERICHIA coli of phenols and their bactericidal activity.
- J. Pharm. Pharmacol., 18, 1075, (1966).
- BENARDE A. - Disinfection.
- Marcel Dekker, Inc. New-York, 1970.
- BENVENISTE R., DAVIES J. - Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics : role of hydroxyle and amino-groups.
- Antimicrob. Ag. Chemother, 4, (4), 402-409, (1973).
- BERES A.J., COONS T.L., KAELEN M.J. - Synthesis and antibacterial properties of substituted decylbarbituric acids.
- J. Pharm. Sci., 63, (3), 469, (1974).
- BERGAN T., LYSTAD A. - Evaluation of disinfectants inactivators.
- Acta. Pathol. Microbiol. Scand. B., 80, 507-510, (1972).
- BERGAN T., LYSTAD A. - Disinfectant evaluation by a capacity use-dilution test.
- J. Appl. Bact., 34, (4), 741-750, (1971).

- BERNHEIM F. - Differential effects of lipophilic and sulphhydryl agents on the swelling and potassium efflux of *PSEUDOMONAS aeruginosa*.
- *Cytobios*, 9, (33-34), 33-38, (1974).
- BORY J., DESVIGNES A., JUND Y. - Mécanismes d'action des médicaments antibactériens.
- *Prod. Probl. Pharm.*, 18, 413-418, (1963).
- BOUSSOUGUANT Y., WITCHITZ J., HORNSTEIN M., CHRISTOL D. - Etude comparative de trois ammoniums quaternaires et du borate de phénylmercure sur 600 souches d'origine hospitalière.
- *Path. Biol.*, 21, (8), 871-878, (1973).
- Mc BRIDE R.J., MACKIE M.A.L. - Evaluation of the antibacterial activity of contact lens solutions.
- *J. Pharm. Pharmacol.*, 26, (11), 899, (1974).
- BRITISH STANDARD 808. - Modified technique of the Chick-Martin test for disinfectants.
- British Standard Institution, London, 1938.
- CAPEK A., NEMCOVA D., JANATA V. - Antimicrobial agents. XXIII Antifungal activity of diphenylmethane derivatives.
- *Folia Microbiol.*, 20, 52-53, (1975).
- CAPEK A., SIMEK A., BRUNA L., SVAB A., BUDESINSKY Z. - Antimicrobial agents. XXI Dependence of antifungal activity on the structure of the side chain in the pyrimidine group.
- *Folia Microbiol.*, 19, (2), 169-171, (1974).
- CARSON L.A., FAVERO M.S., BOND W.W., PETERSEN N.J. - Factors affecting comparative resistance of naturally occurring and subcultured *PSEUDOMONAS aeruginosa* to disinfectants.
- *Appl. Microbiol.*, 23, (5), 863-869, (1972).
- CHABBERT Y.A. - L'Antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Collection "Techniques de base". La Tourelle. Ed. Paris, 1963.
- CHIHARA S., ITO A., YAHATA M., TOBITA T., KOYAMA Y. - Chemical synthesis, isolation and characterization of α -N-fattyacyl colistin nonapeptide with special reference to the correlation between antimicrobial activity and carbon number of fattyacyl moiety.
- *Agr. Biol. Chem.*, 38, (3), 521-530, (1974).
- CLUZEL R., JOLY B., CLUZEL M., SIROT J. - Evaluation de l'activité bactéricide d'un antiseptique par la méthode de filtration sur membrane.
- *Path. Biol.*, 21, (8), 861-869, (1973).

- COBURN R.A., GLENNON R.A., CHMIELEWICZ Z. Mesoionic Purinone Analogs 7. In vitro antibacterial activity of Mesoionic. 1.3.4. Thiadiazolo 3.2.-a pyrimidine -5.7 diones.
- J. Med. Chem., 17, 1025, (1974).
- COULTHARD C.E., MARSHALL J., PYMAN F.L. - Variations of phenol coefficients in homologous series of phenols.
- J. Chem. Soc., 280-291, (1930).
- COWEN R.A. - Relative merits of "in use" and laboratory methods for the evaluation of antimicrobial products.
- J. Soc. Cosmet. Chem., 25, (6), 307, (1974).
- CREMIEUX A., DUMENIL G., JACQUET-FRANCILLON M.L., GREBUS Ch. - Etude comparative de quelques neutralisants des ammoniums quaternaires. Influence de la nature des souches bactériennes utilisées.
- Path. Biol., 23, (1), 29-33, (1975).
- CREMIEUX A., JACQUET-FRANCILLON M.L., DUMENIL G., GREBUS Ch. - Problèmes posés par le contrôle d'activité des bactéricides utilisés en hygiène hospitalière.
- Med. Mal. Infect., 3, (11), 413-419, (1973).
- DAGLEY S., DAWES E.A., MORRISON G.B. - Inhibition of growth of AEROBACTER aerogenes. The mode of action of phenols, alcohols, acetone and ethyl acetate.
- J. Bact., 60, 369-379, (1950).
- DALTREY D.C., HUGO W.B. - Studies on the mode of action of the antibacterial agent chlorhexidine on CLOSTRIDIUM perfringens. 2. Effects of chlorhexidine on metabolism and on the cell membrane.
- Microbios, 11, (44), 137, (1975).
- DANKERT J., SCHUT I.K. - The antibacterial activity of chloro xlenol in combination with ethylenediaminetetra-acetic acid.
- J. Hyg., 76, (1), 11, (1976).
- DELMOTTE A., BEUMER J. - Sensitivity of PSEUDOMONAS aeruginosa towards antiseptics and antibiotics.
- Therapie, 29, 71-80, (1974).
- DESBORDES J., JOURDAN R. - Recherche des meilleurs tests de bactériostase dans la sélection ou le contrôle des substances antiseptiques pures et des préparations commerciales.
Path. Biol., 21, (8), 837-844, (1973).
- DESBORDES J., JOURDAN R. - Influence of bacterial enzymes on molecular degradation of antiseptics used as preservatives in medical preparations.
- in Develop. Biol. Stand., 24, 77-90, S.Karger, Basel 1974.

- DESVIGNES A., BERNARD J., SEBASTIEN F., FROMIER M. -
Etude de quelques agents conservateurs. Contrôle de leur
efficacité dans une préparation émulsionnée.
- Ann. Pharm. Franç., 32, 37-52, (1974).
- DIMMOCK J.R., QURESHI A.M., NOBLE L.M., SMITH P.J., BAKER H.A. -
Comparison of antimicrobial activity of nuclear-substituted
aromatic esters of 5-dimethyl-amino-1-phenyl-3-pentanol
and 3-dimethylamino-1-phenyl-1-propanol with related cyclic
analogs.
- J. Pharm. Sci., 65, (1), 38, (1976).
- DIMMOCK J.R., TURNER W.A. - Synthesis and stereochemistry
of 2-dimethylaminométhyl-6-phenylcyclohexanol and related
esters with antimicrobial activity.
- Can. J. Pharm. Sci., 9, (2), 33-36, (1974).
- DUCHENNE J. - Des modalités d'action des solvants organiques
sur l'évolution des courbes de croissance bactérienne.
- Thèse, doctorat d'Etat en Pharmacie. Paris, 1961.
- DUCHER D., COUQUELET J., CLUZEL R., COUQUELET J. -
 α -amino γ -céto-esters à activité antibactérienne.
- Chim. Ther., 8, (5), 552-558, (1973).
- DULONG DE ROSNAY Ch., FOURTILLAN J.B. - Antiseptiques et
Antisepsie.
- Documentation Sarget, 1974.
- ELKHOULY A.E., YOUSEF R.T. - Antibacterial efficiency of
mercurials.
- J. Pharm. Sci., 63, (5), 681, (1974).
- FERRES H., BASKER M.J., O'HANLON P.J. - β -lactam antibiotics.
I Comparative structure activity relationships of 6-amino
penicillanic acid derivatives and their 6(-D- α acylamino
phenylacetamido) penicillanic acid analogues.
- J. Antibiotics, 27, (12), 922-930, (1974).
- FINLAND M. - Antimicrobial drugs.
- Clin. Pharmacol. Ther., 16, (5), 914-918, (1974).
- FLEURETTE J., TRANSY M.S., FLANDROIS J.P., BRUN Y., LAURAS E. -
Evaluation de l'activité bactéricide du chlorure de
Benzalkonium au moyen d'un ensemenceur à sites multiples.
- Path. Biol., 21, (8), 845-850, (1973).
- GERSHON H., SHANKS L. - Fungitoxicity of 1,4-naphtoquinones
to CANDIDA albicans and TRICHOPHYTON mentagrophytes.
Can. J. Microbiol., 21, (9), 1317, (1975).

- GILLELAND H.E., STINNETT J.D., EAGON R.G. - Ultrastructural and chemical alteration of the cell envelope of *PSEUDOMONAS aeruginosa* associated with resistance to ethylenediaminetetraacetate resulting from growth in a Mg ++ deficient medium.
- J. Bact., 117, (1), 302, (1974).
- GREBUS Ch., CREMIEUX A., JACQUET-FRANCILLON M.L., DUMENIL G. - Détermination de l'activité bactéricide du chlorure de Benzalkonium par numération des survivants après neutralisation de l'antiseptique.
- Path. Biol., 21, (8), 851-859, (1973).
- GUINET R., CARRAZ M. - Comment choisir un conservateur et étudier son efficacité dans les produits cosmétiques. Standardisation des méthodes ?
- Xe Semaine Internationale de Dermocosmétologie, Lyon, 1976.
- HAMILTON W.A. - The mode of action of membrane active antibacterials.
- Febs. Symp., 20, 71, (1970).
- HAMILTON W.A. - The mechanism of the bacteriostatic action of tetrachlorosalicylanilide : a membrane active antibacterial compound.
- J. Gen. Microbiol., 50, 441, (1968).
- HAMMOND S.M., KLIGER B.N. - Studies on the optical density changes in suspensions of *CANDIDA albicans* NCT 713 induced by the polyene antibiotic candicidin.
- Microbios, 13, (51), 15, (1975).
- HAQUE H., RUSSELL A.D. - Effect of chelating agents on the susceptibility of some strains of Gram-negative bacteria to some antibacterial agents.
- Antimicrob. Ag. Chemother., 6, 200-206, (1975).
- HAQUE H., RUSSEL A.D. - Effect of ethylenediaminetetra-acetic acid and related chelating agents on whole cells of Gram-negative bacteria.
- Antimicrob. Ag. Chemother., 5, (5), 447-452, (1974).
- HOWARTH W.R., TEWARI R.P., SOLOTOROVSKY M. - Comparative in vitro antifungal activity of Amphotericin B and Amphotericin B methyl-ester.
- Antimicrob. Ag. Chemother., 7, (1), 58-63, (1975).
- HUGO W.B. - The mode of action of antibacterial agents.
- J. Appl. Bact., 30, (1), 17-50, (1967).

- HUGO W.B., BLOOMFIELD S.F. - Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent, Fentichlor against STAPHYLOCOCCUS aureus and ESCHERICHIA coli. III The effect of Fentichlor on the metabolic activities of STAPHYLOCOCCUS aureus and ESCHERICHIA coli.
- J. Appl. Bact., 34, 579, (1971).
- HUGO W.B., BOWEN J.G. - Studies on the mode of action of 4-ethylphenol on ESCHERICHIA coli.
- Microbios, 8, (31-32), 189-198, (1973).
- HUGO W.B., DALTREY D.C. - Studies on the mode of action of the antibacterial agent chlorhexidine on CLOSTRIDIUM perfringens I - adsorption of chlorhexidine on the cell, its antibacterial activity and physical effects.
- Microbios, 11, (44), 119, (1975).
- HUGO W.B., LONGWORTH A.R. - Some aspects of the mode of action of chlorhexidine.
- J. Pharm. Pharmacol., 16, 655-662, (1964).
- JAMINET F. - Agents conservateurs et paramètres déterminant leur efficacité.
- Il Farmaco, 25, 457-500 (1970).
- JORDAN R.C., JACOBS S.E. - The dynamics of disinfection. I New data on the reaction between phenol and BACTERIUM coli with an analysis of the distribution of resistance among the cells of the bacterial population studied.
- J. Hyg., 49, 275-289, (1944).
- JOURDAN R. - Contrôle de l'activité antibactérienne des antiseptiques et désinfectants.
- Thèse, doctorat médecine. Montpellier, 1972.
- KAUFMANN H., NEUSSEL H., LINSSENMEIER G. - Probleme der Empfindlichkeitstestung von Bakterien mit dem Agar-Diffusions test. Korrelationsstatistik und Konstruktion eines Entscheidungsverfahrens.
- Arzn. Forsch. 23, (6), 743, (1973).
- KELSEY J.C., SYKES G. - A new test for the assessment of disinfectants with particular reference to their use in hospitals.
- Pharm. J., 202, 607, (1969).
- KELSEY J.C., BEEBY M.M., WHITEHOUSE C.M. - A capacity use-dilution test for disinfectants.
- Mont. Bull. Minis. Health Lab. Serv., 24, 152-160, (1965).
- KING J.A., WOODSIDE W., Mc GUCKEN P.V. - Relationship between pH and antibacterial activity of glutaraldehyde.
- J. Pharm. Sci., 63, (5), 804, (1974).

- MACKINNON I.H. - The use of inactivators in the evaluation of disinfectants.
- J. Hyg., 73, (2), 189, (1974).
- KITAGAWA T., MIURA T., TANAKA S., TANIYAMA H. - Relationships between antimicrobial activities and chemical structures of reduced products of viomycin.
- J. Antibiotics, 26, (9), 528, (1973).
- LALONDE R.T., AMY INN MEI TSAI, CHUN JUAN WANG, CHUNFOOK WONG, GIGI LEE. - Preparation and in vitro antifungal activities of some quinolizidine derived hemiaminals and B-tert amino sulfides.
- J. Med. Chem., 19, (2), 214, (1976).
- LAMBIN S. - Méthode de mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques.
- Thèse, doctorat es-sciences, Paris, 1933.
- LAMBIN S. - Les substances chimiques antiseptiques : état actuel de la question.
- Prod. Probl. Pharm., 18, 107-124, (1963).
- LAMBIN S., DESVIGNES A., LELUAN G. - Application de la technique de filtration sur membrane à la détermination de l'activité bactéricide partielle et totale de quelques substances à l'égard de PSEUDOMONAS aeruginosa. Comparaison des résultats obtenus avec ceux fournis par d'autres méthodes.
- Ann. Pharm. Franç., 30, (4), 255-262, (1972a).
- LAMBIN S., DESVIGNES A., LELUAN G. - Etude bactéricide de quelques antiseptiques à l'égard de PSEUDOMONAS aeruginosa.
- Ann. Pharm. Franç., 30, (2), 109-116, (1972b).
- LAMBIN S., SEBASTIEN F., BERNARD J. - La technique des membranes filtrantes appliquée à l'essai de stérilité des substances antibiotiques.
- Ann. Pharm. Franç., 20, 749-767, (1962).
- LAMBIN S., SEBASTIEN F., BERNARD J. - Détermination de l'activité bactéricide de substances antiseptiques par la technique de filtration sur membrane. Intérêt et limites de cette technique.
- Ann. Pharm. Franç., 22, (11-12), 641-648, (1964).
- LAWRENCE C.A., BLOCK S.S. - Disinfection, sterilization and preservation.
- Lea Febiger, Philadelphia, 1971.
- LELUAN G. - Effet du pH sur l'activité bactériostatique de l'oléandomycine à l'égard des bacilles Gram -.
Ann. Biol. Clin., 29, 159-161, (1971).

- LELUAN G. - Principales techniques de recherche et d'évaluation du pouvoir antibactérien in vitro d'une substance chimique.
1. Techniques de détermination de l'activité bactériostatique.
- Labo. Pharm., Probl. Techn., 205, 43-48, (1971).
- LELUAN G. - Principales techniques de recherche et d'évaluation du pouvoir antibactérien in vitro d'une substance chimique.
2. Techniques de détermination de l'activité bactéricide.
- Labo. Pharma., Probl. Techn., 206, 26-30, (1972).
- LODDER J. - The yeasts : a taxonomic study.
- North Holland, Amsterdam, 1970.
- MISIEK M., MOSES A.J., PURSIANO T.A., LEITNER F., PRICE K.E. -
In vitro activity of cephalosporins against Mycobacterium tuberculosis H37 Rv : structure-activity relationships.
- J. Antibiotics, 26, (12), 737-744, (1973).
- MUNTON T.J., RUSSELL A.D. - Effect of glutaraldehyde on cell viability, triphenyltetrazolium reduction, oxygen uptake and β galactosidase activity in ESCHERICHIA coli.
- Appl. Microbiol., 26, (4), 508, (1973).
- MUNTON I.J., RUSSELL A.D. - Effect of glutaraldehyde on the outer layers of ESCHERICHIA coli.
- J. Appl. Bact., 35, 193-199, (1972).
- NAKAO H., FUKUSHIMA M., YANAGISAWA H., SUGAWARA S. - Studies on chemotherapeutic agents. II. Synthesis and antibacterial activity of 5-substituted-5,8 dihydro-8- oxopyrrole (2,3-b) pyrazine-7- carboxylic acids.
- Chem. Pharm. Bull., 22, 1864, (1974).
- NANBA H., KURODA H. - Studies on fungicides XI. Biosynthesis of β Glucan and Chitin like substance of cell from Cochliobolus miyabeanus.
- Chem. Pharm. Bull., 22, 1895, (1974).
- NORTON D.A., DAVIES D.J.C., RICHARDSON N.E., MEAKIN B.J., KEALL A.
- The antimicrobial efficiency of contact lens solutions.
- J. Pharm. Pharmacol., 26, (11), 841-848, (1974).
- ORGANIC SYNTHESIS - Collective vol. II, Wiley sons, p.67, 1943a.
- ORGANIC SYNTHESIS - Collective vol. II, Wiley sons, p.408, 1943b.
- PAPADAKI-VALIKAKI A., TSATSAS G., VARONOS D., DELITHEOS A., -
Synthèse et action pharmacologique de quelques nouveaux acides hydroxamiques.
- Ann. Pharm. Franç., 32, (2), 133-138, (1974).

- PERRIN D.R., BIGGS D.R., CRUICKSHANK I.A.M. - Phaseollidin, a phytoalexin from *Phaseolus vulgaris* : isolation, physicochemical properties and antifungal activity.
- Aust. J. Chem., 27, (7), 1607, (1974).
- PESSON M., ANTOINE M., CHABASSIER S., GEIGER S., GIRARD R., RICHER D., DE LAJUDIE P., HORVATH E., LERICHE B., PATTE S., - Antibacterial derivatives from 8-alkyl 5-oxo-5, 8 dihydro pyrido (2,3-d) pyrimidine 6 carboxylic acids. I. New procedure.
- Eur. J. Med. Chem., Chem. Ther., 9, (6), 585, (1975a).
- PESSON M., ANTOINE M., CHABASSIER S., GEIGER S., GIRARD P., RICHER D., DE LAJUDIE P., HORVATH E., LERICHE B., PATTE S. - Antibacterial derivatives from 8-alkyl 5-oxo-5, 8 dihydro pyrido (2,3-d) pyrimidine 6 carboxylic acids. II. 2-piperazinyl and 2-(4-alkyl-piperazinyl) derivatives.
- Eur. J. Med. Chem., Chem. Ther., 9, (6), 591, (1975b).
- PRINCE J., DEVERILL C.E., AYLIFFE A.J. - A membrane filter technique for testing disinfectants.
- J. Clin. Path., 28, (1), 71-76, (1975).
- POWERS L.J., - Chemistry and antibacterial activity of nitro benzofurans.
- J. Med. Chem., 19, (1), 57, (1975).
- PROUDFOOT S.G., DAVDANI B.H. - Interactions of chlorinated phenols with bacterial phosphatidylethanol amine monolayers in relation to antibacterial action.
- J. Pharm. Pharmacol., 27, supp. 23, (1975).
- RAKHIT S., SINGH K., - Structure-activity relationships in sixteen membered macrolide antibiotics.
- J. Antibiotics, 27, (3), 221-224, (1974).
- RAPPE A. - Biological determination of antimicrobials with *ESCHERICHIA coli*.
- Ann. Pharm. Franç., 31, (6), 435-440, (1973).
- RAWAL B.D., Mc KAY G., BLACHALL M.I. - Inhibition of *PSEUDOMONAS aeruginosa* by ascorbic acid acting singly and in combination with antimicrobials : in vitro and in vivo studies.
- Med. J. Austr., 1, (6), 169-173, (1974).
- REBER H., FLEURY C., GASCHEN M., HESS E., REGAMEY R., RITTER P., TANNER F., WISCHER W. -
Evaluation et contrôle des désinfectants et procédés de désinfection.
- Société Suisse de Microbiologie, Juin 1972.

- REDDISH G.F. - Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization.
- 2e ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1957.
- RICHARDS R.M.E., Mc BRIDE R.J. - Enhancement of Benzalkonium chloride and chlorhexidine acetate activity against PSEUDOMONAS aeruginosa by aromatic alcohols.
- J. Pharm. Sci., 62, (12), 2035-2037, (1973).
- RICHARDS R.M.E., CAVILL R.H. - Electron microscope study of effect of Benzalkonium chloride and edetate disodium on cell envelope of PSEUDOMONAS aeruginosa.
- J. Pharm. Sci., 65, (1), 76, (1976).
- RIDEAL S., WALKER J.T.A. - The standardization of disinfectants.
- J. Roy. San. Inst., 24, 424-441, (1903).
- RUSSELL A.D. - Factors influencing the activity of antimicrobial agents : an appraisal.
- Microbios, 10, (38-39), 151, (1974).
- SABATH L.D., TOFTEGAARD I. - Rapid microassays for clindamycin and gentamycin when present together and the effect of pH and of each on the antibacterial activity of the other.
- Antimicrob. Ag. Chemother., 6, (1), 54, (1974).
- SAEKI H., SHIMADA Y., OHASHI Y., SUGAWARA S., OHKI E. - Synthesis of neamine derivatives and their antibacterial activities.
- Chem. Pharm. Bull., 22, (5), 1151-1158, (1974).
- SAHARIA G.S., SHARMA H.R. - Studies in heterocyclic compounds : Part I. Synthesis of 3-(p-methoxyphenyl)-5-phenyl-4-(substitued sulphonamido-benzeneazo) pyrazoles and evaluation of their antibacterial properties.
- J. Ind. Chem. Soc., 51, (2), 351-353, (1974a).
- SAHARIA G.S., SHARMA H.R. - Studies in heterocyclic compounds : Part II. Synthesis of ethyl (arylsulphonamidobenzeneazo) pyrazol-5-ones and evaluation of their antibacterial properties.
- J. Ind. Chem. Soc., 51, (2), 354-357 (1974b).
- SAID S.A., LAMBIN S., GERMAN A., BERNARD J. - Etude comparative de quelques méthodes de détermination de l'activité bactéricide in vitro. Intérêt et limites de la technique par centrifugation.
- Ann. Pharm. Franç., 21, 187-189, (1963).
- SCHMIDT B. - The state of disinfectant testing. At the same time a report on the activities of the general disinfectant committee of the german society for Hygiene und Microbiology.
- Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. B, 158, (5), 456-464, (1974).

- SCHROTTER E.W., WEUFFEN W., HERUDEK D. - Correlations of chemical constitution and germicid activity. Part 27.
- Die Pharmazie, 29, (6), 374-382, (1974).
- SEGRETAİN G., DROUHET E., MARIAT F. - Diagnostic de laboratoire en Mycologie médicale.
- Collection "Technique de base". La Tourelle ed. Paris, 1964.
- SHAFI M.S. - Determination of antimicrobial MIC by paper diffusion method.
- J. Clin. Pathol., 28, (12), 989-992, (1975).
- SHUKLA J.P., AGRAWAL Y.K., KUCHYA K.P. - Preparation and properties of some p-substituted benzolhydroxamic acids.
J. Ind. Chem. Soc., 51, (3), 437-439, (1974).
- SMITH G. - Ethylene diamine tetra-acetic acid and the bactericidal efficiency of some phenolic disinfectants against PSEUDOMONAS aeruginosa.
- J. Med. Lab. Technol., 27, 203-206, (1970).
- SPICHER G. - Désinfectants et procédés de désinfection étudiés tout spécialement sous l'angle de facteurs susceptibles de modifier leur efficacité et leur valeur utilitaire.
- Patho. Microbiol., 36, 259-276, (1970).
- STUART L.S., ORTENZIO L.F., FRIEDL J.L. - The phenol coefficient number as an index to the practical use-dilution for disinfection.
- J. A.O.A.C., 38, 465-478, (1955).
- SUTER C.M. - Relationships between the structures and bactericidal properties of phenols.
- Chem. Rev., 28, 269, (1941).
- SYKES G. - Disinfection and sterilization : theory and practice.
- 2e ed. Chapman and Hall Ed., London, 1968.
- VALLON J.J. - La désinfection cutanée.
- Lyon Pharm., 23, (1), 21-28, (1972).
- VANBREUSEGHEM R. - Guide pratique de Mycologie médicale et vétérinaire.
- Masson ed., Paris, 1966.

- VINCENT FALQUET M.F., PERRIN R., AUREILLE-SALVADORI G.,
CARRAZ M., VEYSSEYRE C., TACHON P., VINCENT-FALQUET J.C. -
Synthèse, caractérisation physicochimique et activité
pharmacologique de dérivés chlorés de méthylisopropylphénols.
- Eur. J. Med. Chem., Chem. Ther., 9, (1), 69-75, (1974).
- WAGNER G., SHADOMY S., PAXTON L.D., ESPINELL-INGROFF A. -
New method for susceptibility testing with antifungal
agents.
- Antimicrob. Ag. Chemother., 8, (1), 107, (1975).
- WISEMAN D. - The mechanics of inhibition of growth by some
antibacterial agents.
- J. Pharm. Pharmacol., 26, supp. 100-101, (1974).
- WOODSIDE W. - Studies on the mode of action of dibromopropanidine.
- Microbios, 8, (29), 23, (1973).
-

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
PLAN	
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	1
1. Méthodes d'étude in vitro du pouvoir antibactérien	3
2. Buts de travail	26
DEUXIEME PARTIE : RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTI MICROBIENNE D'UNE SERIE D'ACIDES HYDROXAMIQUES	28
1. Matériel et méthodes	29
2. Résultats	43
TROISIEME PARTIE : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PRODUITS RETENUS	57
1. Matériel et méthodes	59
2. Résultats	71
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION	82
1. Concentrations minimales inhibitrices	84
2. Action sur les bactéries en phase exponen- tielle de croissance et concentrations minimales bactéricides	90
3. Essai de relation structure-activité anti bactérienne	93
4. Perspectives	100
RESUMES	101
CONCLUSIONS	103
BIBLIOGRAPHIE	104

